

ENGLISH TRANSLATION OF

PCT PUBLICATION: WO 2004/038018 A1

**Entitled: "GENE EXPRESSED SPECIFICALLY IN DOPAMINE-
PRODUCING NEURON PRECURSOR CELLS AFTER
TERMINATION OF DIVISION (GENE SPECIFICALLY
EXPRESSED IN POSTMITOTIC DOPAMINERGIC NEURON
PRECURSOR CELLS)"**

Cited in Information Disclosure Statement

Re: US National Phase of PCT/JP2004/000629

Int'l Filing Date: January 23, 2004

Attorney Docket No.: 082368-004900US

DESCRIPTION

GENE SPECIFICALLY EXPRESSED IN POSTMITOTIC DOPAMINERGIC NEURON
PRECURSOR CELLS

5

Technical Field

The present invention relates to the novel 65B13 gene expressed in postmitotic dopaminergic neurons. Dopaminergic neuron precursor cells used in transplant therapy for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD) can be efficiently isolated by 10 detecting this gene.

Background Art

The dopamine system is an extremely important system for essential motor regulation, hormone secretion regulation, emotion regulation, and such in the mammalian brain. Thus, 15 abnormalities in dopaminergic neural transmission cause various neural disorders. For example, Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease of the extrapyramidal system that occurs due to specific degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain (Harrison's Principles of Internal Medicine, Vol. 2, 23rd edition, Isselbacher et al., ed., McGraw-Hill Inc., NY (1994), pp. 2275-7). Oral administration of 20 L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) is performed as a primary therapeutic method to compensate for the decrease in the amount of dopamine produced; however, the duration of the effect is known to be unsatisfactory.

More recently, a therapeutic method in which the midbrain ventral zone of 6 to 9-week old aborted fetuses containing dopaminergic neuron progenitor cells are transplanted 25 to compensate for the loss of dopaminergic neurons was attempted (US 5690927; Spencer et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8; Freed et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1549-55; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63; Kordower et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332: 1118-24; Defer et al. (1996) Brain 119: 41-50; Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80). However, in addition to cell supply and ethical issues (Rosenstain (1995) Exp. 30 Neurol. 33: 106; Turner et al. (1993) Neurosurg. 33: 1031-7), this method is currently under criticism for various other problems, including risk of infection and contamination, immunological rejection of transplants (Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-980; Widner and Brudin (1988) Brain Res. Rev. 13: 287-324), and low survival rates due to fetal 35 tissues' primary dependence on the lipid metabolism rather than glycolysis (Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106).

In order to resolve the ethical issues and shortage of supply, methods have been

proposed that use, for example, porcine cortex, stria, and midbrain cells (for example, Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-508487, Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-508488 or Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-509034). In these methods, a complex procedure that involves the alteration of cell surface antigens (MHC class I antigens) is required. Therefore, the use of an *in vitro* differentiation system to generate dopaminergic neurons from non-neural cells such as embryonic stem (ES) cells and bone marrow interstitial cells instead of cells derived from aborted fetuses, is considered promising. The importance of regeneration therapy using ES cells or a patient's own neural stem cells is likely to grow in the future. A method involving local immunosuppression by simultaneously transplanting Sertoli's cells has been proposed as a method of eliminating transplant rejection (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-509170, Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-501818, Selawry and Cameron (1993) Cell Transplant 2: 123-9). It is possible to obtain transplant cells from relatives that have matching MHCs, bone marrow from other individuals, bone marrow banks, or umbilical cord-blood banks. However, if it were possible to use the patient's own cells, the problem of rejection reactions can be overcome without any laborious procedures and trouble.

An additional problem is the possibility that neuron progenitor cells may differentiate into groups of heterogeneous cells. In treating Parkinson's disease, it is necessary to selectively transplant those catecholamine-containing neurons that produce dopamine. Examples of transplant cells that have been proposed in the past for use in the treatment of Parkinson's disease include striatum (Lindvall et al. (1989) Arch. Neurol. 46: 615-31; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63), immortalized cell lines derived from human fetal neurons (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 8-509215; Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-506930; Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-522070), human postmitotic neurons derived from NT2Z cells (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 9-5050554), primordial neuron cells (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-509729), and cells and bone marrow stroma cells transfected with exogenous genes so as to produce catecholamines such as dopamines (Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-504503; Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-513545). However, none of these contain only the dopaminergic neurons or cells that differentiate into dopaminergic cells.

A method has been proposed for selectively concentrating and isolating dopaminergic neurons from undifferentiated cell populations. In this method, a reporter gene that expresses a fluorescent protein is introduced into each cell of the cell population, under the control of a

promoter/enhancer of genes, such as the tyrosine hydroxylase expressed in dopaminergic neurons, and then cells that emit fluorescence are isolated. The dopaminergic neurons are visualized in their viable state, and concentrated, isolated, and identified (Unexamined Published Japanese Patent Application No. 2002-51775). This method requires the step of 5 introducing an exogenous gene, and further, the presence of a reporter gene poses problems of toxicity and immunogenicity for use in gene therapy.

Disclosure of the Invention

One of the major problems in Parkinson's disease (PD) transplant therapy at the 10 moment is that *in vitro* differentiated dopaminergic neuron precursor cells and midbrain ventral zone of aborted fetuses are both mixtures of myriad types of cells. When considering the safety in neural circuit formation, it is preferable to use isolated cells that comprise only the cell type of interest. Furthermore, when considering the risk of tumorigenesis, it is believed that it would be better to use isolated postmitotic neuron. Moreover, when 15 considering the survival of cells at their transplant site in the brain, and their ability to properly form a network, it is expected that therapeutic effects can be further improved by isolating precursor cells at as early a stage as possible. Therefore, the inventors of the present invention aimed to isolate a gene specific to dopaminergic neuron precursor cells.

In order to isolate a gene specific to dopaminergic neuron precursor cells, genes with 20 differential expressions were amplified by improving the subtraction method (N-RDA; representational differential analysis method; RDA method (Listsyn NA (1995) Trends Genet. 11: 303-7)), ("Method for Homogenizing the Amount of DNA Fragments and Subtraction Method", Japanese Patent Application No. 2001-184757 (filing date: June 19, 2001)) using E12.5 mouse ventral and dorsal midbrain RNA, and analyzing the sequences of the amplified 25 genes. As a result, the novel gene 65B13 was obtained. Two alternative isoforms, named 65B13-a and 65B13-b, were also obtained from determining the gene's full-length sequence by the RACE method. The nucleotide sequences of the isoforms are designated as SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2. The amino acid sequences of proteins encoded by the nucleotide sequences are indicated as SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4, respectively (Figs. 1 to 4).

30 Based on the expression analysis results of these genes by *in situ* hybridization, and expression patterns obtained by comparison with those of the spinal cord growth marker Ki67 and the maturation marker NCAM, 65B13 was thought to be expressed transiently in neural precursor cells immediately after cell cycle exit. Moreover, 65B13 expression in the midbrain overlapped with that of tyrosine hydroxylase (TH), a marker gene of dopaminergic 35 neurons, along the dorsal-ventral axial direction. Therefore, 65B13 is thought to be expressed specifically and transiently in dopaminergic neuron precursor cells immediately

after cell cycle exit (Figs. 10 and 11).

The *in situ* hybridization results were further supported by immunostaining using an anti-65B13 antibody (Fig. 13). Moreover, populations of cells expressing 65B13 could be efficiently separated by flow cytometry using an anti-65B13 antibody (Fig. 14).

5 According to the above results, anti-65B13 antibodies can be used to obtain pure early-stage dopaminergic neuron precursor cells, by isolating 65B13-expressing cells from ventral midbrain region or culture media that contain *in vitro*-differentiated dopaminergic neurons. Cells obtained in this manner contain only postmitotic precursor cells, and since only the cell type of interest is isolated, these cells are extremely safe even when used for 10 transplant therapy. Since the earliest possible precursor cells are used, high therapeutic efficacy can be expected in terms of their survival rate, network formation ability, and such. Further, in the cases where the best therapeutic effects cannot be achieved by these early precursor cells obtained immediately after cell cycle exit, and where the use of matured cells is required, early precursor cells obtained by this method can simply be cultured *in vitro* to 15 mature into a suitable stage of differentiation. Thus, materials that are in a differentiation stage suitable for the target transplant therapy can be easily prepared (Fig. 12).

Moreover, pure dopaminergic neuron precursor cells are also useful for the search of therapeutic targets for Parkinson's disease, isolation of genes specific for dopaminergic neurons precursor cells or stage-specific genes during the maturation of dopaminergic neuron 20 precursor cells, and the like. In addition, the earliest possible precursor cells obtained using the methods of the present invention can also be used to unravel the maturation process of dopaminergic neurons, to screening systems using maturation as an indicator, and such.

More specifically, the present invention relates to:

[1] a polynucleotide that comprises a sequence selected from the nucleotide 25 sequences of (1) to (4), wherein the nucleotide sequences encode 65B13 polypeptide expressed specifically in dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit, or antigenic fragment thereof:

- (1) a nucleotide sequence that comprises the 177th to 2280th nucleotides of SEQ ID NO: 1 or the 127th to 2079th nucleotides of SEQ ID NO: 2, or sequence complementary to said 30 nucleotide sequence;
- (2) a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4, or sequence complementary to said nucleotide sequence;
- (3) a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4, wherein a signal sequence portion is deleted, or sequence complementary to said nucleotide 35 sequence;
- (4) a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4,

wherein one or more amino acids have been deleted, inserted, substituted, or added, or sequence complementary to said nucleotide sequence; and,

(5) a nucleotide sequence that hybridizes with the nucleotide sequence (1) under stringent conditions;

5 [2] a vector that comprises the polynucleotide of [1];

[3] a host cell that comprises the polynucleotide of [1] or the vector of [2];

[4] a polypeptide that is encoded by the polynucleotide of [1];

[5] a fragment of the polypeptide of [4], wherein the polypeptide fragment comprises at least eight amino acid residues;

10 [6] an antibody against the polypeptide of [4] or the polypeptide fragment of [5];

[7] a nucleotide chain that encodes the polypeptide fragment of [5];

[8] a method for selecting a dopaminergic neuron, wherein the method comprises the step of contacting the antibody of [6] with a cell sample thought to comprise a dopaminergic neuron precursor cell;

15 [9] a method for selecting a dopaminergic neuron, wherein the method comprises the step of contacting a peptide comprising at least the extracellular portion of the polypeptide of [4] with a cell sample thought to comprise a dopaminergic neuron precursor cell;

[10] a Dopaminergic neuron precursor cell immediately after cell cycle exit, wherein the cell is selected by the method of [8] or [9];

20 [11] a method for isolating a gene specific to a dopaminergic neuron precursor cell, and a gene specific to each stage of maturation into a dopaminergic neurons, wherein the method comprises the step of: detecting and isolating a gene specifically expressed in the precursor cell of [10] or a cell differentiated, induced, or proliferated from said precursor cell; and

25 [12] a method for screening using maturation as an indicator, wherein the method comprises the steps of: contacting a test substance with the precursor cell of [10]; and detecting the differentiation or proliferation of the precursor cell resulting from the contacting step.

30 <Polynucleotides>

35 Polynucleotides of the present invention can be applied to generate antigens by genetic engineering techniques to produce antibodies that can be used for the selection of dopaminergic neuron precursor cells. A polynucleotide of the present invention encodes the 65B13 polypeptide specifically expressed in dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit, and comprises nucleotides 177 to 2280 of SEQ ID NO: 1 (Figs. 1 and 2), nucleotides 127 to 2079 of SEQ ID NO: 2 (Figs. 3 and 4), or a sequence complementary to

either of these sequences.

Here, a "polynucleotide" refers to a polymer comprising nucleotides or nucleotide pairs of multiple deoxyribonucleic acids (DNA) or ribonucleic acids (RNA), and includes DNA, cDNA, genomic DNA, chemically synthesized DNA, and RNA. If needed,

5 polynucleotides can also contain non-naturally-occurring nucleotides such as 4-acetylcytidine, 5-(carboxyhydroxymethyl)uridine, 2'-O-methylcytidine, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluridine, dihydrouridine, 2'-O-methylpseudouridine, β -D-galactosylqueuosine, 2'-O-methylguanosine, inosine, N6-isopentenyladenosine, 1-methyladenosine, 1-methylpseudouridine,

10 1-methylguanosine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanosine, 2-methyladenosine, 2-methylguanosine, 3-methylcytidine, 5-methylcytidine, N6-methyladenosine, 7-methylguanosine, 5-methylaminomethyluridine, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouridine, β -D-mannosylqueuosine, 5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine, 5-methoxycarbonylmethyluridine, 5-methoxyuridine, 2-methylthio-N6- isopentenyladenosine,

15 N-((9- β -D-ribofuranosyl-2- methylthiopurin-6-yl)carbamoyl)threonine, N-((9- β -D-ribofuranosylpurin-6-yl)N-methylcarbamoyl)threonine, uridine-5-oxyacetic acid-methyl ester, uridine-5-oxyacetic acid, wybutoxosine, pseudouridine, queuosine, 2-thiocytidine, 5-methyl-2-thiouridine, 2-thiouridine, 4-thiouridine, 5-methyluridine, N-((9- β -D-ribofuranosylpurin-6-yl)carbamoyl)threonine, 2'-O-methyl-5-methyluridine,

20 2'-O-methyluridine, wybutoxine, and 3-(3-amino-3-carboxy propyl)uridine.

Moreover, a polynucleotide of the present invention encodes the 65B13 polypeptide specifically expressed in dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit, and comprises an amino acid sequence described in SEQ ID NO: 3 (Figs. 1, 3 and 5) or SEQ ID NO: 4 (Figs. 2, 4 and 5), or a complementary sequence thereof. In addition to the nucleotide sequences described in SEQ ID NOs: 1 and 2, nucleotide sequences encoding such an amino acid sequences include those that differ from the sequences described in SEQ ID NOs: 1 and 2 due to degeneracy of the genetic code. A polynucleotide of the present invention can be designed to express a polypeptide using genetic engineering techniques, by selecting a nucleotide sequence that has a high expression efficiency in view of the host's codon usage frequency (Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: 43-74). The polynucleotides of the present invention also comprise a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence lacking the signal sequence portion of the amino acid sequence described in SEQ ID NO: 3 or 4. The first 17 amino acid residues of the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4 correspond to a signal sequence.

35 The polynucleotides of the present invention also comprise a nucleotide sequence encoding the 65B13 polypeptide specifically expressed in dopaminergic neuron precursor cells

immediately after cell cycle exit, or an antigenic fragment thereof, wherein one or more amino acids in the amino sequence of SEQ ID NO: 3 or 4 are deleted, inserted, substituted, or added, or a sequence complementary to this nucleotide sequence. It is well known that a mutant polypeptide comprising an amino acid sequence, in which one or more amino acids are deleted, 5 inserted, substituted, or added, maintain the same biological activity as the original polypeptide (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13).

Here, an amino acid substitution refers to a mutation in which one or more amino acid 10 residues in a sequence are changed to a different type of amino acid residue. When the amino acid sequence encoded by a polynucleotide of the present invention is altered by such a substitution, a conservative substitution is preferably carried out if the function of the protein is to be maintained. A conservative substitution means altering a sequence so that it encodes an amino acid that has properties similar to those of the amino acid before substitution. 15 Amino acids can be classified, based on their properties, into non-polar amino acids (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val), non-charged amino acids (Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr), acidic amino acids (Asp, Glu), basic amino acids (Arg, His, Lys), neutral amino acids (Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val), aliphatic amino acids (Ala, Gly), branched amino acids (Ile, Leu, Val), hydroxyamino acids (Ser, Thr), amide-type amino 20 acids (Gln, Asn), sulfur-containing amino acids (Cys, Met), aromatic amino acids (His, Phe, Trp, Tyr), heterocyclic amino acids (His, Trp), imino acids (Pro, 4Hyp), and such. In particular, substitutions among Ala, Val, Leu, and Ile; Ser and Thr; Asp and Glu; Asn and Gln; Lys and Arg; and Phe and Tyr, are preferable in order to maintain protein properties. There are no particular limitations on the number and sites of the mutated amino acids, as long as the 25 amino acid encoded by the polynucleotide has 65B13 antigenicity.

A polynucleotide encoding an amino acid sequence, in which one or more amino acids are deleted, inserted, substituted, or added to the sequence of SEQ ID NO: 3 or 4, can be prepared according to methods such as site-directed mutagenesis described in (Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. (Cold Spring Harbor Press (1989)), Current Protocols in 30 Molecular Biology (John Wiley & Sons (1987-1997); especially Section 8.1-8.5), Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92, Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67, Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6), and others.

Moreover, a polynucleotide of the present invention is a polynucleotide comprising a 35 nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions with a nucleotide sequence comprising nucleotides 177 to 2280 of SEQ ID NO: 1 or nucleotides 127 to 2079 of SEQ ID

NO: 2, or a sequence complementary to either of these sequences, wherein the polynucleotide encodes a 65B13 polypeptide specifically expressed in dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit, or an antigenic fragment thereof. In addition to the two 65B13 isoforms having sequences represented by SEQ ID NOs: 1 and 2 obtained in the

5 Examples of the present invention, alternative isoforms and allelic mutations may also exist. Thus, such alternative isoforms and allelic mutations are also included in polypeptides of the present invention. Such polypeptides can be obtained from cDNA libraries or genomic libraries derived from animals such as humans, mice, rats, rabbits, hamsters, chickens, pigs, cows, goats, and sheep, by using a polynucleotide probe consisted of a nucleotide sequence

10 comprising nucleotides 177 to 2280 of SEQ ID NO: 1 or nucleotides 127 to 2079 of SEQ ID NO: 2, in known hybridization methods such as colony hybridization, plaque hybridization, or Southern blotting. See "Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed." (Cold Spring Harbor Press (1989)) for methods of cDNA library construction. In addition, a commercially available cDNA library or genomic library may also be used.

15 More specifically, in constructing a cDNA library, total RNA is first prepared from cells, organs, tissues, or such that express a polynucleotide of the present invention, by known techniques such as guanidine ultracentrifugation (Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-5299) or AGPC (Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-159), followed by purification of mRNA using the mRNA Purification Kit (Pharmacia), or such. A

20 kit for direct mRNA preparation, such as the QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia), may also be used. Next, cDNA is synthesized from the resulting mRNA using reverse transcriptase. cDNA synthesis kits such as the AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (Seikagaku Corporation) are also available commercially. Other methods that use the 5'-RACE method to synthesize and amplify cDNA by PCR may also be

25 used (Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32). In addition, in order to construct cDNA libraries containing a high percentage of full-length clones, known techniques such as the oligo-capping method (Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56) can also be employed. The cDNA obtained in this manner is then incorporated

30 into a suitable vector.

Examples of hybridization conditions in the present invention include "2x SSC, 0.1% SDS, 50°C", "2x SSC, 0.1% SDS, 42°C" and "1x SSC, 0.1% SDS, 37°C". Examples of conditions of higher stringency include "2x SSC, 0.1% SDS, 65°C", "0.5x SSC, 0.1% SDS, 42°C" and "0.2x SSC, 0.1% SDS, 65°C". More specifically, a method that uses the

35 Rapid-hyb buffer (Amersham Life Science) can be carried out by performing pre-hybridization at 68°C for 30 minutes or more, adding a probe to allow hybrid formation at

68°C for 1 hour or more, washing three times in 2x SSC/0.1% SDS at room temperature for 20 minutes each, washing three times in 1x SSC/0.1% SDS at 37°C for 20 minutes each, and finally washing twice in 1x SSC/0.1% SDS at 50°C for 20 minutes each. This can also be carried out using, for example, the Expresshyb Hybridization Solution (CLONTECH), by

5 performing pre-hybridization at 55°C for 30 minutes or more, adding a labeled probe and incubating at 37°C to 55°C for 1 hour or more, washing three times in 2x SSC/ 0.1% SDS at room temperature for 20 minutes each, and washing once at 37°C for 20 minutes with 1x SSC/0.1% SDS. Here, conditions of higher stringency can be achieved by increasing the temperature for pre-hybridization, hybridization, or second wash. For example, a

10 pre-hybridization and hybridization temperature of 60°C can be raised to 68°C for higher stringency. In addition to factors such as salt concentration of the buffer and temperature, a person with ordinary skill in the art can also integrate other factors such as probe concentration, probe length, and reaction time, to obtain murine 65B13 isoforms and allelic mutants attained in the Examples of the present invention, and corresponding genes derived

15 from other organisms.

References such as Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed. (Cold Spring Harbor Press (1989); Section 9.47-9.58), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons (1987-1997); Section 6.3-6.4), DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed. (Oxford University (1995); Section 2.10 for conditions, in particular), can be referred to for detailed information on hybridization procedures. Examples of hybridizing polynucleotides include polynucleotides containing a nucleotide sequence that has at least 50% or more, preferably 70%, more preferably 80% and even more preferably 90% (for example, 95% or more, or 99%) identity with a nucleotide sequence comprising nucleotides 177 to 2280 of SEQ ID NO: 1 or nucleotides 127 to 2079 of SEQ ID NO: 2. Such identities can be determined by the BLAST algorithm (Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7). Examples of programs that have been developed based on this algorithm include the BLASTX program for determining the identity of amino acid sequences, and the BLASTN program for nucleotide sequences (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10). These programs can be used for the sequences of the present invention (see <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> for a specific example of analysis methods).

65B13 isoforms or allelic mutants, and other genes with a 65B13-like structure or function, can be obtained from cDNA libraries and genome libraries of animals such as humans, mice, rats, rabbits, hamsters, chickens, pigs, cows, goats, and sheep, by designing

35 primers based on the nucleotide sequences of SEQ ID NOS: 1 and 2, using gene amplification technology (PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987)

Sections 6.1-6.4).

For example, BLAST search results revealed three human sequences of unknown function that are 84% identical to the nucleotide sequence of mouse 65B13 of the present invention (GenBank Accession No.: XM_048304, AL136654, BC007312). The respective 5 nucleotide sequences are listed as SEQ ID NOS: 5, 7, and 9, with their predicted amino acid sequences listed as SEQ ID NOS: 6, 8, and 10, and are considered human homologues of mouse 65B13. According to the methods of the present invention, such human homologues can be used to select human dopaminergic neuron precursor cells. All three sequences are believed to be sequences derived from the same gene on chromosome 19, based on reported 10 information. Among them, two sequences AL136654 (SEQ ID NO: 7) and BC007312 (SEQ ID NO: 9) are cDNA fragments, while the third sequence XM_048304 (SEQ ID NO: 5) is considered an mRNA sequence predicted from the genome sequence. These predicted sequences have ORFs that are similar in size to 65B13 of the present invention, and the predicted amino acid sequences share an 84% identity with 65B13.

15 The polynucleotide sequences of the present invention can be confirmed by using conventional sequence determination methods. For example, the dideoxynucleotide chain termination method (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) can be used. In addition, sequences can also be analyzed using a suitable DNA sequencer.

20 <Nucleotide Chains>

Moreover, a nucleotide chain complementary to a polynucleotide of the present invention comprising at least 15 nucleotides is provided by the present invention. Here, a "complementary sequence" refers to not only cases where at least 15 consecutive nucleotides of the nucleotide sequence completely pair with the template, but also includes those that have 25 at least 70%, preferably 80%, more preferably 90% and even more preferably 95% or more (for example, 97% or 99%) of the consecutive nucleotides paired with the template. Pair formation refers to the formation of a chain, in which T (U in the case of an RNA) corresponds to A, A corresponds to T or U, G corresponds to C, and C corresponds to G in the nucleotide sequence of the template polynucleotide. Identities can be determined by methods similar to 30 that used in the aforementioned polynucleotide hybridization.

Such a nucleotide chain of the present invention can be used as a probe for detecting or isolating, or as a primer for amplifying the polynucleotides of the present invention. The nucleotide chain normally consists of 15 to 100, and preferably 15 to 35 nucleotides when used as a probe, or at least 15 and preferably 30 nucleotides when used as a primer. A primer 35 can be designed to have a restriction enzyme recognition sequence, a tag or such, added to the 5'-end side thereof, and at the 3' end, a sequence complementary to a target sequence. A

nucleotide chain of the present invention can hybridize with a polynucleotide of the present invention. Moreover, mutations of a polynucleotide of the present invention within cells can be detected using these probes or primers. In some cases, such mutations may cause abnormalities in the activity or expression of the polypeptides of the present invention, 5 therefore, nucleotide chains of the present inventions are thought to be useful for disease diagnosis and such.

In addition, the nucleotide chains of the present invention include antisense nucleic acids that suppress the cellular expression of a polynucleotide of the present invention by binding to an mRNA or DNA, and ribozymes that suppress via specific cleavage of mRNA.

10 Examples of antisense mechanisms to suppress target gene expression include: (1) inhibition of transcription initiation via triplex formation, (2) transcription suppression through hybrid formation at sites of local open-loop structure formed by RNA polymerases, (3) transcription inhibition through hybrid formation with RNA during synthesis, (4) suppression of splicing through hybrid formation at intron-exon junctions, (5) suppression of splicing 15 through hybrid formation at sites of spliceosome formation, (6) suppression of mRNA migration to the cytoplasm through hybrid formation with mRNA, (7) suppression of splicing through hybrid formation at a capping site or poly A addition site, (8) suppression of translation initiation through hybrid formation at the binding sites of initiation factors, (9) translation suppression through hybrid formation at ribosome binding sites, (10) suppression 20 of peptide chain elongation through hybrid formation at mRNA coding regions or polysome binding sites, and (11) suppression of gene expression through hybrid formation at sites of nucleic acid/protein interaction (Hirashima and Inoue, "New Biochemistry Experiment Course 2, Nucleic Acids IV, Gene Replication and Expression", Japanese Biochemical Society edit., Tokyo Kagaku Dozin Publishing, pp. 319-347 (1993)).

25 An antisense nucleic acid contained in a nucleotide chain of the present invention may be a nucleic acid that inhibits gene expression by any of the mechanisms described in (1) to (11) above. Namely, it may contain an antisense sequence to not only the coding region, but also to a non-coding region sequence of a target gene whose expression is to be inhibited. A DNA that encodes an antisense nucleic acid can be used by linking to a suitable regulatory 30 sequence that allows its expression. The antisense nucleic acid does not need to be completely complementary to the coding region or non-coding region of a target gene, as long as it can effectively inhibit the expression of the gene. Such antisense nucleic acids have a chain length of at least 15 bp or more, preferably 100 bp or more, and more preferably 500 bp or more, and are normally within 3000 bp, preferably within 2000 bp and more preferably 35 within 1000 bp. It is preferred that such antisense nucleic acids share an identity of 90% or more, and more preferably 95% or more, with the complementary chain of a target gene

transcription product. These antisense nucleic acids can be prepared according to the phosphothionate method (Stein (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 3209-3221) using the polynucleotides of the present invention.

“Ribozyme” is a generic term referring to catalysts with an RNA component, and

5 ribozymes are broadly classified into large ribozymes and small ribozymes. Large ribozymes are enzymes that cleave the phosphate-ester bonds of a nucleic acid and leave the reaction sites with 5'-phosphoric acid and 3'-hydroxyl group at the end of a reaction. Large ribozymes are further classified into (1) group I intron RNAs, which undergo guanosine-initiated trans-esterification reactions at 5'-spliced sites, (2) group II intron RNAs, which undergo

10 two-step self-splicing reactions with a resultant lariat structure, and (3) RNA components of ribonuclease P, which cleave precursor tRNAs at their 5' side via hydrolysis reactions. In contrast, small ribozymes are comparatively small structural units (about 40 bp) that cleave RNAs, forming 5'-hydroxyl groups and 2'-3' cyclic phosphoric acids. Small ribozymes include, for example, hammerhead-type ribozymes (Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225) and hairpin-type ribozymes (Buzayan (1986) *Nature* 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 6571; H. Kikuchi (1992) *Chemistry and Biology* 30: 112). Since ribozymes are easily altered and synthesized, various modification methods are known. For example, hammerhead-type ribozymes that recognize and cleave nucleotide sequence UC, UU, or UA within a target RNA can be created, by designing the substrate binding portion of a

20 ribozyme to be complementary to an RNA sequence near the target site (Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225; M. Koizumi and E. Ohtsuka (1990) *Protein, Nucleic Acid, and Enzyme* 35: 2191; Koizumi et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7059). Hairpin-type ribozymes can also be designed and produced using known methods (Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 6571; H. Kikuchi (1992) *Chemistry and Biology* 30: 112).

25 Antisense nucleic acids and ribozymes comprised in the nucleotide chains of the present invention can also be used as virus vectors derived from retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, and such, non-virus vectors that use liposomes, or naked DNAs, to control gene expression in cells using *ex vivo* or *in vivo* methods for gene therapy.

30 The nucleotide sequences of the nucleotide chains of the present invention can be confirmed by the same methods used for the aforementioned polynucleotides.

<Vectors>

Vectors comprising a polynucleotide of the present invention are provided by the present invention. A vector of the present invention is useful for carrying a polynucleotide of

35 the present invention within host cells, or for expressing a polypeptide encoded by the polynucleotide. This vector includes various vectors such as plasmids, cosmids, viruses,

bacteriophages, cloning vectors, and expression vectors (Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987)). In a preferred embodiment, a polynucleotide of the present invention is expressed in a host cell, into which a vector of the present invention has been introduced, by linking to the downstream of a regulatory sequence. Here, "regulatory sequence" includes promoters, ribosome binding sites, and terminators in the case of a prokaryotic host cell, and promoters and terminators in the case of a eukaryotic host cell, and in some cases, may also contain transactivators, transcription factors, poly A signals which stabilize transcription products, splicing and polyadenylation signals, and others. Such a regulatory sequence comprises all the components required for the expression of a polynucleotide linked thereto. In addition, a vector of the present invention preferably comprises a selection marker. Moreover, a signal peptide required for transferring an intracellularly expressed polypeptide into the lumen of the endoplasmic reticulum, or the periplasm or extracellular space when the host is a Gram negative microbe, can also be incorporated into an expression vector by linking to a polypeptide of interest. Such a signal peptide may comprise the 17 amino acid residues seen in naturally-occurring 65B13. Alternatively, it can be a signal peptide derived from a heterogeneous protein. Moreover, a linker may be added, and a start (ATG) or stop codon (TAA, TAG or TGA) may be inserted as necessary.

A vector of the present invention is preferably an expression vector. An "expression vector" refers to a construct capable of expressing a polypeptide encoded in an expression vector in target host cells *in vitro*. The expression vectors of the present invention include cloning vectors, binary vectors, integration vectors, and such. Expression processes include transcription of the coding sequence comprised on an expression vector into translatable mRNA, translation of the mRNA into a polypeptide of the present invention, and in some cases, secretion of the expressed polypeptide into the lumen of the endoplasmic reticulum, the periplasm, or extracellular space.

pBEST (Promega) is an example of a vector capable of expressing polynucleotides *in vitro*. In addition, examples of promoters capable of expressing polynucleotides in prokaryotic cells such as *E. coli*, include P_L , *araB* (Better et al. (1988) *Science* 240: 1041-3), *lacZ* (Ward et al. (1989) *Nature* 341: 544-6; Ward et al. (1992) *FASEB J.* 6: 2422-7), *trp*, *tac* and *trc* (fusion of *lac* and *trp*). In addition, terminators derived from *trpA*, phages, and *rrnB* ribosomal RNAs can also be used. Moreover, vectors to be used in *E. coli* preferably have an "ori" for amplifying the vector within a host, and a marker gene for selecting a transformed host. The use of a drug resistance gene is preferred, which allows the host to be distinguished by drugs such as ampicillin, tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol. The

pe1B signal sequence can be used, particularly if the polypeptide is intended for secretion into the periplasm (Lei et al. (1987) *J. Bacteriol.* 169: 4379). Examples include M13 vectors, pUC vectors, pBR322, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), pEGFP, pBluescript (Stratagene), and pET (Invitrogen; a preferable host for this vector is BL21 expressing the T7 polymerase). In addition, subcloning or excision vectors can be exemplified by pGEM-T, pDIRECT and pT7, in particular.

An example of a bacterial host other than *E. coli* is the genus *Bacillus*, and examples of vectors include pUB110 and pc194 vectors. Specific examples include pPL608 and pKTH50 derived from *Bacillus subtilis*. Vectors have also been developed for host bacteria, for example, genus *Pseudomonas* such as *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas cepacia*, genus *Brevibacterium* such as *Brevibacterium lactofermentum* (pAJ43 (Gene 39: 281 (1985) etc.)), genus *Corynebacterium* such as *Corynebacterium glutamicum* (pCS11 (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Sho 57-183799); pCB101 (Mol. Gen. Genet. 196: 175 (1984), etc.)), genus *Streptococcus* (pHV1301 (FEMS Microbiol. Lett. 26: 239 (1985)); pGK1 (Appl. Environ. Microbiol. 50: 94 (1985)), etc.), genus *Lactobacillus* (pAM β 1 (J. Bacteriol. 137: 614 (1979), etc.)), genus *Rhodococcus* such as *Rhodococcus rhodochrous* (J. Gen. Microbiol. 138: 1003 (1992)), and genus *Streptomyces* such as *Streptomyces lividans* and *Streptomyces virginiae* (see *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*, Hopwood et al., Cold Spring Harbor Laboratories (1985); pIJ486 (Mol. Gen. Genet. 203: 468-478 (1986)), pKC1064 (Gene 103: 97-9 (1991)), pUWL-KS (Gene 165: 149-50 (1995))). See literatures such as "Basic Microbiology Course 8 - Genetic Engineering" (Kyoritsu Publishing) for useful vectors in microbe hosts. Techniques such as the calcium chloride method (Mandel and Higa (1970) *J. Mol. Biol.* 53: 158-162; Hanahan (1983) *J. Mol. Biol.* 166: 557-580) and electroporation can be employed to introduce a vector into a host.

Further, regulatory elements for expression in eukaryotic cell hosts are exemplified by the AOX1 and GAL1 promoters for yeast hosts. Examples of expression vectors derived from yeasts include the Pichia Expression Kit (Invitrogen), pNV11 and SP-Q01. Vectors that can be used in yeasts are described in detail in, for example, *Adv. Biochem. Eng.* 43: 75-102 (1990) and *Yeast* 8: 423-88 (1992). More specifically, vectors such as YRp, YEp, Ycp, and YIp can be used in genus *Saccharomyces* such as *Saccharomyces cerevisiae*. Integration vectors (such as EP537456), which allow a large number of gene copies to be inserted, and can stably maintain the inserted genes, are particularly useful. Other examples of vectors include 2 μ m vectors derived from *S. cerevisiae*, pKD1 vectors (J. Bacteriol. 145: 382-90 (1981), pGK11-derived vectors, and *Kluyveromyces* autonomous replication gene KARS vectors for genus *Kluyveromyces* such as *Kluyveromyces lactis*; vectors described in *Mol. Cell. Biol.* 6: 80 (1986) and pAUR224 (Takara Shuzo) for genus *Schizosaccharomyces*;

pSB3-derived vectors (Nucleic Acids Res. 13: 4267 (1985)) for genus *Zygosaccharomyces*; vectors described in literatures such as Yeast 7: 431-43 (1991), Mol. Cell. Biol. 5: 3376 (1985) and Nucleic Acids Res. 15: 3859 (1987) for genus *Pichia* such as *Pichia angusta* and *Pichia pastoris*; vectors described in Unexamined Published Japanese Patent Application No. Hei 5 8-173170 or vectors using ARS derived from *Candida maltosa* (Agri. Biol. Chem. 51: 1587 (1987)) for *C. maltosa*, *C. albicans*, *C. tropicalis* or *C. utilis*; vectors described in Trends in Biotechnology 7: 283-7 (1989) for genus *Aspergillus* such as *Aspergillus niger* and *A. oryzae*; and vectors using promoters derived from the extracellular cellulase gene (Bio/technology 7: 596-603 (1989)) in genus *Trichoderma*.

10 For hosts of mammalian cells or other animal cells, the adenovirus late promoter (Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946), CAG promoter (Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200), CMV immediate-early promoter (Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9), EF1 α promoter (Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 5322; Kim et al. (1990) Gene 91: 217-23), HSV TK promoter, SR α promoter (Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466), SV40 promoter (Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108), SV40 early promoter (Genetic Engineering Vol. 3, Williamson ed., Academic Press (1982) pp. 83-141), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94), RSV (Rous sarcoma virus)-LTR promoter (Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704), MMLV-LTR promoter, CMV enhancer, SV40 enhancer and globin intron, and such can be used.

15 Moreover, the vector preferably comprises a drug resistance gene to allow cells to be distinguished by drugs such as neomycin or G418. To increase the number of gene copies within cells, the number of copies can be amplified by using methotrexate (MTX) in, for example, a CHO host which is defective in the nucleic acid synthesis pathway, and employing a vector such as pCHOI, which has a DHFR gene to compensate for the defect. On the other hand, in order to transiently express a gene, COS cells having an SV40 T antigen gene on their chromosomes can be used as the host, and a vector having an SV40 replication origin, such as pcD, or a vector having a replication origin of adenovirus, bovine papilloma virus (BPV), polyoma virus, and such can be used. Moreover, a gene encoding aminoglycoside transferase (APH), thymidine kinase (TK), xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (Ecogpt), dihydrofolic acid reductase (dhfr), or such may be included as a selection marker for amplifying the gene copy number. Known examples of suitable vectors are the Okayama-Berg expression vector pcDV1 (Pharmacia), pCDM8 (Nature 329: 840-2 (1987)), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pSPORT1 (GIBCO BRL), pSV2dhfr (Mol. Cell. Biol. 1: 854-64 (1981)), pEF-BOS (Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990)), pCEP4 (Invitrogen), pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV, pOP13, and pME18S (Mol. Cell. Biol. 8: 466-72 (1988)).

In particular, examples of vectors used to express a polynucleotide of the present invention in animals *in vivo* include adenovirus vectors such as pAdexlcw and retrovirus vectors such as pZIPneo. A vector can be introduced into a host using methods such as the adenovirus methods, electroporation (Cytotechnology 3: 133 (1990)), cationic liposome methods (Cationic Liposome DOTAP (Boehringer Mannheim), etc.), introduction using positively charged polymers, electrostatic type liposome methods, internal type liposome methods, particle gun methods, liposome methods, lipofection (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987)), calcium phosphate methods (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Hei 2-227075), receptor-mediated gene introduction methods, retrovirus methods, DEAE dextran methods, virus-liposome methods (Experimental Medicine Supplement, "Basic Technology of Gene Therapy", Yodosha (1997); Experimental Medicine Supplement, "Experimental Method of Gene Introduction and Expression Analysis", Yodosha (1997); J. Clin. Invest. 93: 1458-64 (1994); Am. J. Physiol. 271: R1212-20 (1996); Molecular Medicine 30: 1440-8 (1993); Experimental Medicine 12: 1822-6 (1994); Protein, Nucleic acid, and Enzyme 42: 1806-13 (1997); Circulation 92 (Suppl. II): 479-82 (1995)), and naked-DNA direct introduction methods. Vectors generated using virus vectors derived from viruses other than adenoviruses and retroviruses, such as adeno-associated virus, Sindbis virus, Sendai virus, Togavirus, Paramyxovirus, poxvirus, poliovirus, herpes virus, lentivirus and vaccinia virus, can also be used. Administration into the living body may be carried out using *ex vivo* or *in vivo* methods.

In addition, insect expression systems are also known as systems for expressing heterogeneous polypeptides. For example, exogenous genes can be expressed in *Spodoptera frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae cells, using the *Autographa californica* nucleopolyhedrosis virus (AcNPV) as a vector. Here, an exogenous gene of interest is cloned into the non-essential region of a virus. For example, it may be linked to a region under the control of a polyhedrin promoter. In this case, the polyhedrin gene is deactivated, a recombinant virus lacking the coat protein is produced, and a polypeptide of interest is expressed in cells of *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia* larvae, or such, that have been infected with the virus (Smith (1983) J. Virol. 46: 584; Engelhard (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3224-7). Other known examples of insect cell-derived expression vectors include the Bac-to-BAC Baculovirus Expression System (Bigco BRL) and pBacPAK8.

When plant cells are used as a host, for example, vectors that use the 35S promoter of cauliflower mosaic virus can be used. Known methods of introducing a vector into plant cells include the PEG electroporation, Agrobacterium methods, and particle gun methods.

Insertion of a DNA into a vector can be carried out in a ligase reaction using restriction enzyme sites (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987)

Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63).

<Hosts>

5 The present invention provides hosts that comprise a polynucleotide or vector of the present invention. An *in vitro* or *in vivo* production system may be employed for the production of a polypeptide of the present invention. Hosts of the present invention include archaebacterial, bacterial, fungal, plant, insect, fish, amphibian, reptilian, avian, and mammalian prokaryotic and eukaryotic cells. A host of the present invention comprises in its 10 cells a polynucleotide that encodes a polypeptide of the present invention. As long as the polynucleotide does not exist at a naturally occurring position in the genome of a host cell, the polynucleotide may be regulated by its own promoter, incorporated into the host genome, or maintained as an extrachromosomal structure.

15 Examples of bacterial hosts include Gram positive and Gram negative bacteria belonging to the genus Escherichia, Streptococcus, Staphylococcus, Serratia or Bacillus, such as E. coli (JM109, DH5 α , HB101 and XL1Blue), Serratia marcescens, and Bacillus subtilis.

20 Examples of a eukaryotic host include fungal cells such as yeasts, higher plants (Nicotiana tabacum derived cells), insects (Drosophila S2, Spodoptera Sf9, Sf21, Tn5), fish, amphibians (Xenopus oocytes (Valle et al. (1981) Nature 291: 358-40), reptiles, birds, and mammals (CHO (J. Exp. Med. 108: 945 (1995). Among them, DHFR gene-deficient dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20 (1980) and CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275 (1968)), COS, Hela, C127, 3T3, BHK, HEK293 and Bowes melanoma cells), myeloma, Vero, Namalwa, Namalwa KJM-1 and HBT5637 (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Sho 63-299), and plants (potato, tobacco, corn, rice, rape, 25 soybean, tomato, wheat, barley, rye, alfalfa, and hemp), are included. In addition to Saccharomyces cerevisiae belonging to the genus Saccharomyces, and yeasts belonging to the genus Pichia, expression systems that use fungi as a host, such as the cells of Aspergillus niger belonging to the mold Aspergillus, are also known.

30 Introduction of a vector into host cells can be carried out using methods such as the electroporation (Chu et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26), cationic liposome methods, electric pulse terebration (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Sections 9.1 to 9.9), direct injection using a microscopic glass tube, microinjection, lipofection (Derijard (1994) Cell 7: 1025-37; Lamb (1993) Nature Genetics 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) Science 259: 230-4), lipofectamine method (GIBCO-BRL), calcium phosphate method 35 (Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 2745-52), DEAE dextran method (Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussman and Milman (1985) Mol. Cell. Biol. 4:

1642-3) and FuGene6 reagent (Boehringer-Mannheim).

<Polypeptides and Polypeptide Fragments>

A "polypeptide" of the present invention refers to a peptide polymer encoded by a polynucleotide of the present invention. Preferred examples include proteins having the amino acid sequence described in SEQ ID NOs: 3 or 4. The polypeptides of the present invention may comprise naturally occurring or modified amino acid residues. Examples of amino acid residue modifications include acylation, acetylation, amidation, arginylation, GPI anchor formation, crosslinking, γ -carboxylation, cyclization, covalent crosslink formation, glycosylation, oxidation, covalent bonding of a lipid or fat derivative, cystine formation, disulfide bond formation, selenoylation, demethylation, protein fragmentation treatment, covalent bonding of a nucleotide or nucleotide derivative, hydroxylation, pyroglutamate formation, covalent bonding of a flavin, prenylation, covalent bonding with a heme portion, covalent bonding of phosphatidyl inositol, formylation, myristoylation, methylation, ubiquitination, iodination, racemization, ADP-ribosylation, sulfation and phosphorylation. Moreover, the polypeptides of the present invention include precursors containing a signal peptide portion, mature proteins lacking a signal peptide portion, and fusion proteins modified with other peptide sequences. Peptide sequences to be added to a polypeptide of the present invention can be selected from sequences that facilitate protein purification using, for example, pcDNA3.1/Myc-His vector (Invitrogen), or those that confer stability in recombinant protein production. Examples of such sequences are influenza agglutinin (HA), glutathione S transferase (GST), substance P, multiple histidine tag (such as 6x His and 10x His), protein C fragment, maltose-binding protein (MBP), immunoglobulin constant region, α -tubulin fragment, β -galactosidase, B-tag, c-myc fragment, E-tag (epitope on a monoclonal phage), FLAG (Hopp et al. (1988) Bio/Technol. 6: 1204-10), lck tag, p18 HIV fragment, HSV-tag (human simple Herpes virus glycoprotein), SV40T antigen fragment, T7-tag (T7 gene 10 protein), and VSV-GP fragment (vesicular stomatitis virus glycoprotein).

Moreover, the present invention also provides fragments of the polypeptides of the present invention. A polypeptide fragment of the present invention is identical to a portion of a polypeptide of the present invention, and comprises at least eight amino acid residues or more (for example, 8, 10, 12 or 15 amino acid residues or more). A particularly preferable fragment can be exemplified by a polypeptide fragment lacking an amino terminus, carboxyl terminus, and transmembrane domain. The polypeptide fragments of the present invention include fragments containing an α -helix and α -helix forming region, α -amphipathic region, β -sheet and β -sheet forming region, β -amphipathic region, substrate binding region, high antigen index region, coil and coil forming region, hydrophilic region, hydrophobic region,

turn and turn forming region, and surface forming region. A polypeptide fragment of the present invention may be any fragment, provided that it has the antigenicity of a polypeptide of the present invention. The antigen-determining site of a polypeptide can be predicted using methods for analyzing protein hydrophobicity and hydrophilicity of an amino acid sequence (Kyte-Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157: 105-22), or methods of secondary structure analysis (Chou-Fasman (1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 251-76), and can be confirmed using a computer program (*Anal. Biochem.* 151: 540-6 (1985) , or the PEPSCAN method in which a short peptide is synthesized followed by confirmation of its antigenicity (Published Japanese Translation of International Publication No. Sho 60-500684).

5 The polypeptides or polypeptide fragments of the present invention can be produced by using known genetic recombination techniques or chemical synthesis. When producing a polypeptide or polypeptide fragment of the present invention using genetic recombination techniques, the produced protein may or may not be subjected to glycosylation depending on the type of host selected, and may differ in molecular weight, isoelectric point or such.

10 Normally when a polypeptide is expressed using a prokaryotic cell such as *E. coli* as the host, the resulting polypeptide is produced in a form that has a methionine residue attached to the N terminus of the original polypeptide. Polypeptides having different structures due to such differences in host are also included in the polypeptides of the present invention.

15 20 <Polypeptide Production>

For *in vitro* polypeptide production, polypeptides can be produced in an *in vitro* cell-free system using methods such as *in vitro* translation (Dasso and Jackson (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 3129-44). In contrast, when producing polypeptides using cells, a suitable cell host is first selected from those mentioned above, and then the cells are transformed with a DNA of interest. Subsequently, the transformed cells can be cultured to obtain a polypeptide of interest. Culturing is carried out using known methods that are appropriate for the cell host selected. For example, when animal cells are selected, culturing can be carried out at a pH of about 6 to 8 and a temperature of 30°C to 40°C for about 15 to 200 hours, using a medium such as DMEM (*Virology* 8: 396 (1959)), MEM (*Science* 122: 501 (1952)), RPMI1640 (*J. Am. Med. Assoc.* 199: 519 (1967)), 199 (*Proc. Soc. Biol. Med.* 73: 1 (1950)) or IMDM, and adding serum such as fetal calf serum (FCS), as necessary. In addition, the medium may be replaced, aerated, or stirred, during the course of culturing, as necessary.

25 30 35 On the other hand, in order to establish an *in vivo* polypeptide production system, a DNA of interest is introduced into an animal or plant, and the polypeptide is produced *in vivo*. Examples of known animal systems (*Lubon (1998) Biotechnol. Annu. Rev.* 4: 1-54) include

mammals such as goats, pigs, sheep, mice, and cows, and insects such as silkworms (Susumu (1985) *Nature* 315: 592-4). In addition, transgenic animals can also be used in mammalian systems.

For example, when secreting a polypeptide of interest in goat milk, a DNA that

5 encodes the polypeptide is linked to a DNA that encodes a protein such as β -casein, and a fusion protein of the polypeptide of interest is specifically expressed in milk. Next, the DNA that encodes the fusion protein is introduced into a goat embryo. The embryo harboring this DNA is then transferred back into the uterus of a female goat. The transgenic goats or their offspring born from this female goat secretes the polypeptide of interest in their milk.

10 Hormones may also be administered to increase the amount of milk, as necessary (Ebert et al. (1994) *Bio/Technology* 12: 699-702).

Transgenic plant polypeptide production systems using plants such as tobacco are known. First, a DNA that encodes a polypeptide of interest is incorporated into a plant expression vector such as pMON530, and this vector is then introduced into a bacterium such

15 as *Agrobacterium tumefaciens*. A bacterium harboring this DNA is then used to infect plants such as *Nicotina tabacum*, and the polypeptide of interest can be isolated from the leaves of the resulting transgenic plant upon regeneration of the plant body (Julian et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24: 131-8). Examples of other established methods include methods in which a DNA is introduced into a protoplast using PEG followed by regeneration of the plant body

20 (Gene Transfer to Plants, Potrykus and Spangenberg ed. (1995) pp. 66-74; suitable for Indian rice varieties), methods in which a DNA is introduced into a protoplast by electric pulse followed by regeneration of the plant body (Toki et al. (1992) *Plant Physiol.* 100: 1503-7; suitable for Japanese rice varieties), methods in which a DNA is directly introduced into plant cells using the particle gun method followed by regeneration of the plant body (Christou et al.

25 (1991) *Bio/Technology* 9: 957-62), and methods in which a DNA is introduced into cells via *Agrobacterium* followed by regeneration of the plant body (Hiei et al. (1994) *Plant J.* 6: 271-82). See Toki et al. (1995) *Plant Physiol.* 100: 1503-7 for methods of plant regeneration.

Once a transgenic plant is obtained, a plant host that produces a polypeptide of the present invention can be propagated in the same manner, using the seeds, fruits, tubers, root

30 tubers, stocks, cuttings, calluses, or protoplasts of the plant.

Normally, a polypeptide of the present invention produced by gene recombination techniques can be recovered from the medium if the polypeptide is secreted outside of a cell, or from the body fluid of a transgenic organism. When a polypeptide is produced inside of a cell, the cells are dissolved and the polypeptide is recovered from the dissolved product. The

35 polypeptide of interest is then purified by suitably combining known methods of protein purification such as salting out, distillation, various types of chromatography, gel

electrophoresis, gel filtration, ultrafiltration, recrystallization, acid extraction, dialysis, immunoprecipitation, solvent precipitation, solvent extraction, and ammonium sulfate or ethanol precipitation. Examples of chromatographies include ion exchange chromatography, such as anion or cation exchange chromatography, affinity chromatography, reversed-phase chromatography, adsorption chromatography, gel filtration chromatography, hydrophobic chromatography, hydroxyapatite chromatography, phosphocellulose chromatography, and lectin chromatography (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)).

5 Chromatography can be carried out using a liquid phase chromatography such as HPLC or

10 FPLC.

In addition, naturally-occurring polypeptides can also be purified and obtained. For example, polypeptides can be purified by affinity chromatography using antibodies against the polypeptides of the present invention to be described below (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19). In addition, purification can also be

15 carried out using a glutathione column for GST-fusion proteins, or a nickel column for histidine-tagged fusion proteins. When producing a polypeptide of the present invention in the form of a fusion protein, unwanted portions can be cleaved using thrombin or factor Xa and such, following purification, as necessary. Moreover, the resulting polypeptide can also be modified using enzymes such as chymotrypsin, glucosidase, trypsin, protein kinase, and

20 lysyl endopeptidase, as necessary.

In addition to the aforementioned synthesis and genetic engineering techniques, a polypeptide fragment of the present invention can also be produced by cleaving a polypeptide of the present invention, using suitable enzymes such as peptidase.

25 <Antibodies>

The present invention also provides antibodies against the polypeptides or polypeptide fragments of the present invention. Antibodies of the present invention also include polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies, single-chain antibodies (scFV) (Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The

30 Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol.113, Rosenburg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp.269-315), humanized antibodies, multispecific antibodies (LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9), and antibody fragments such as

35 Fab, Fab', F(ab')2, Fc, and Fv. Moreover, an antibody of the present invention may also be modified by PEG and such, as necessary. An antibody of the present invention may also be

produced in the form of a fusion protein with β -galactosidase, maltose-binding protein, GST, green fluorescent protein (GFP), or such, to allow detection without the use of a secondary antibody. In addition, an antibody may be modified by labeling with biotin or such to allow recovery using avidin, streptoavidin, or such.

5 An antibody of the present invention can be produced using a polypeptide of the present invention, a fragment thereof, or cells in which a polypeptide or polypeptide fragment of the present invention is expressed, as a sensitized antigen. In addition, a short polypeptide of the present invention, or a fragment thereof, may also be used as an immunogen by coupling to a carrier such as bovine serum albumin, Keyhole-limpet hemocyanin, and 10 ovalbumin. In addition, a polypeptide of the present invention, or a fragment thereof, may be used in combination with a known adjuvant such as aluminum adjuvant, Freund's complete (or incomplete) adjuvant, or pertussis adjuvant, to enhance the immune response to an antigen.

15 Polyclonal antibodies can be obtained from, for example, the serum of an immunized animal after immunizing a mammal with a polypeptide of the present invention, or a fragment thereof, coupled to a desired adjuvant. Although there are no particular limitations on the mammals used, typical examples include rodents, lagomorphs, and primates. Specific examples include rodents such as mice, rats and hamsters, lagomorphs such as rabbits, and primates such as monkeys, including cynomolgus monkeys, rhesus monkeys, baboons and chimpanzees. Animal immunization is carried out by suitably diluting and suspending a 20 sensitized antigen in phosphate-buffered saline (PBS) or physiological saline, mixing with an adjuvant as necessary until emulsified, and injecting into an animal intraperitoneally or subcutaneously. The sensitized antigen mixed with Freund's incomplete adjuvant is preferably administered several times, every 4 to 21 days. Antibody production can be confirmed by measuring the level of an antibody of interest in the serum using conventional 25 methods. Finally, the serum itself may be used as a polyclonal antibody, or it may be further purified. See, for example, "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons (1987) Sections 11.12-11.13), for specific methods.

30 A monoclonal antibody can be produced by removing the spleen from an animal immunized in the manner described above, separating immunocytes from the spleen, and 35 fusing with a suitable myeloma cell using polyethylene glycol (PEG) or such to establish hybridomas. Cell fusion can be carried out according to the Milstein method (Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46). Here, suitable myeloma cells are exemplified particularly by cells that allow chemical selection of fused cells. When using such myeloma cells, fused hybridomas are selected by culturing in a culture medium (HAT culture medium) that contains hypoxanthine, aminopterin and thymidine, which destroy cells other than the fused cells. Next, a clone that produces an antibody against a polypeptide of the present

invention, or a fragment thereof, is selected from the established hybridomas. Subsequently, the selected clone is introduced into the abdominal cavity of a mouse or such, and ascites is collected to obtain a monoclonal antibody. See, in addition, "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11), for information on specific methods.

Hybridomas can also be obtained by first sensitizing human lymphocytes that have been infected by EB virus with an immunogen *in vitro*, and fusing the sensitized lymphocytes with human myeloma cells (such as U266) to obtain hybridomas that produce human antibodies (Unexamined Published Japanese Patent Application No. Sho 63- 17688). In addition, human antibodies can also be obtained by using antibody-producing cells generated by sensitizing a transgenic animal with a human antibody gene repertoire (WO92/03918; WO93-02227; WO94/02602; WO94/25585; WO96/33735; WO96/34096; Mendez et al. (1997) *Nat. Genet.* 15: 146-156, etc.). Methods that do not use hybridomas can be exemplified by a method in which a cancer gene is introduced to immortalize immunocytes such as antibody producing lymphocytes.

In addition, antibodies can also be produced by genetic recombination techniques (see Borrebaeck and Larrick (1990) *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, MacMillan Publishers Ltd., UK). First, a gene that encodes an antibody is cloned from hybridomas or antibody-producing cells (such as sensitized lymphocytes). The resulting gene is then inserted into a suitable vector, the vector is introduced into a host, and the host is then cultured to produce the antibody. This type of recombinant antibody is also included in the antibodies of the present invention. Typical examples of recombinant antibodies include chimeric antibodies comprising a non-human antibody-derived variable region and a human antibody-derived constant region, and humanized antibodies comprising a non-human-derived antibody complementarity determining region (CDR), human antibody-derived framework region (FR), and human antibody constant region (Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-9; Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-6; *Methods Enzymol.* 203: 99-121 (1991)).

Antibody fragments of the present invention can be produced by treating the aforementioned polyclonal or monoclonal antibodies with enzymes such as papain or pepsin. Alternatively, an antibody fragment can be produced by genetic engineering techniques using a gene that encodes an antibody fragment (see Co et al., (1994) *J. Immunol.* 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) *Methods Enzymol.* 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) *Methods Enzymol.* 178: 497-515; Lamoyi (1986) *Methods Enzymol.* 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) *Trends Biotechnol.* 9: 132-7).

The multispecific antibodies of the present invention include bispecific antibodies

(BsAb), diabodies (Db), and such. Multispecific antibodies can be produced by methods such as (1) chemically coupling antibodies having different specificities with different types of bifunctional linkers (Paulus (1985) Behring Inst. Mill. 78: 118-32), (2) fusing hybridomas that secrete different monoclonal antibodies (Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9), or

5 (3) transfecting eukaryotic cell expression systems, such as mouse myeloma cells, with a light chain gene and a heavy chain gene of different polyclonal antibodies (four types of DNA), followed by the isolation of a bispecific monovalent portion (Zimmermann (1986) Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9). On the other hand, diabodies are dimer antibody fragments comprising two bivalent polypeptide

10 chains that can be constructed by gene fusion. These can be produced using known methods (see Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; WO93/11161).

Recovery and purification of antibodies and antibody fragments can be carried out using Protein A and Protein G, or according to the protein purification techniques described in detail under "Production of Polypeptides" (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and

15 David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). For example, when using Protein A to purify an antibody of the present invention, known Protein A columns such as Hyper D, POROS or Sepharose F.F. (Pharmacia) can be used. The concentration of the resulting antibody can be determined by measuring the absorbance or by enzyme linked immunoassay (ELISA).

20 Antigen binding activity of an antibody can be determined by absorbance measurement, or by using fluorescent antibody methods, enzyme immunoassay (EIA) methods, radioimmunoassay (RIA) methods, or ELISA. When ELISA is used, an antibody of the present invention is first immobilized onto a support such as a plate. A polypeptide of the present invention is added, and then a sample containing the antibody of interest is added.

25 Here, samples containing an antibody of interest include, for example, culture supernatants of antibody-producing cells, purified antibodies, and such. Next, a secondary antibody that recognizes an antibody of the present invention is added, followed by the incubation of the plate. Subsequently, the plate is washed and the label attached to the secondary antibody is detected. Namely, if a secondary antibody is labeled with alkaline phosphatase, the antigen

30 binding activity can be determined by adding an enzyme substrate such as p-nitrophenyl phosphate, and measuring the absorbance. In addition, a commercially available system such as BIAcore (Pharmacia) can also be used to evaluate antibody activities.

The antibodies of the present invention can be used to purify polypeptides of the present invention, or fragments thereof. In addition, the antibodies of this invention can also be used to obtain dopaminergic neuron precursor cells that can be suitably used in cell transplant therapy for diseases such as Parkinson's disease.

<Selection of Dopaminergic Neurons>

The present invention provides a method of selectively obtaining homogenous populations of dopaminergic neuron precursor cells immediately after the cell cycle exit.

5 More specifically, cells that express a polypeptide of the present invention, namely, immediate postmitotic dopaminergic neuron precursor cells, can be obtained by contacting an antibody against a 65B13 polypeptide of the present invention with a cell sample containing potential dopaminergic neuron precursor cells, and then selecting those cells that have bound to the antibody (see Figs. 12 through 14). The antibody may also be immobilized on a suitable 10 support prior to cellular contact. Alternatively, cells that bind to the antibody can be selectively recovered, by contacting cells with an antibody and allowing them to bind, and purifying by affinity chromatography for the antibody. For example, if an antibody of the present invention is conjugated to biotin, it can be purified on a plate or column bound with avidin or streptoavidin.

15 In addition, 65B13 has an adhesion molecule-like structure with an Ig domain (see Fig. 6) and when it is expressed in cultured cells, cells that express 65B13 adhere to each other, but not to those that do not express 65B13. Therefore, the 65B13-mediated adhesion is considered to involve homophilic binding. Based on such properties of the 65B13 20 polypeptide, dopaminergic neuron precursor cells can also be selected by utilizing the 65B13 polypeptide, particularly the extracellular portion thereof. For example, dopaminergic neuron precursor cells can be obtained by fixing the extracellular portion of the 65B13 25 polypeptide on a suitable support, and then contacting the support with cells. Thus, the present invention provides methods of selecting dopaminergic neuron precursor cells, wherein the methods comprise the step of contacting a peptide comprising at least the extracellular portion of a polypeptide of the present invention with a cell sample containing dopaminergic neuron precursor cells.

In the present invention, immediate postmitotic dopaminergic neuron precursor cells can be efficiently separated by flow cytometry using an anti-65B13 antibody (Example 4, Fig. 14).

30 In addition, dopaminergic neuron precursor cells can also be selected using a promoter for 65B13 (see, for example, Unexamined Published Japanese Patent Application No. 2002-51775). For example, a vector harboring a construct that comprises a gene encoding a detection marker, such as GFP, linked to a promoter region obtained from analyzing the 65B13 expression regions to be described later, can be transfected into cells. In addition, a gene 35 encoding a marker can also be knocked in at the 65B13 gene locus. In either case, specific cells can be selected by detecting the expression of a marker gene specific for dopaminergic

neuron precursor cells.

The cell sample used here preferably comprises cells of the ventral midbrain region or culture medium containing *in vitro* differentiated dopaminergic neurons. *In vitro* differentiation of dopaminergic neurons can be carried out by known methods using cells such as known ES cells, bone marrow interstitial cells, immortalized neuron-derived cell lines (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 8-509215; Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-506930; Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-522070), or primordial neuron cells (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 11-509729), as the starting material. Normally, dopaminergic neurons can be differentiated by co-culturing a tissue obtained from a dopaminergic neuron region of the brain, with a sustentacular cell layer derived from neural tissues. Moreover, methods are also known for deriving dopaminergic cells from neural tissues that normally do not produce dopamine, such as the striatum and cortex (Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 10-509319). In addition, culturing under hypoxic conditions has been reported to produce cells containing a greater number of dopaminergic neurons (Published Japanese Translation of International Publication No. 2002-530068). A cell sample used in the selection of dopaminergic neuron precursor cells of the present invention may be a cell population isolated or cultured by any method.

In addition, it is necessary that a support used in immobilizing an antibody or a polypeptide of the present invention be safe to cells. Examples of such a support include synthetic or naturally-occurring organic polymer compounds, inorganic materials such as glass beads, silica gel, alumina, and activated charcoal, and those that have their surfaces coated with a polysaccharide or synthetic polymer. There are no particular limitations on the form of the support, examples of which include films, fibers, granules, hollow fibers, non-woven fabric, porous supports, or honeycombed supports, and the contact surface area can be controlled by changing its thickness, surface area, width, length, shape, and size in various ways.

30 <Dopaminergic Neuron Precursor Cells>

Since cells obtained in this manner are postmitotic neuron precursor cells, they are preferable in transplant therapy for neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease, in terms of their safety, survival rate, and network formation ability, compared to conventional mixed cell populations or dopaminergic neurons carrying an exogenous gene. Moreover, since cells (or cell populations) of the present invention obtained according to the methods of this invention are immediate postmitotic precursor cells, they can also be differentiated into a

suitable stage by selecting *in vitro* conditions such as media, and are preferable materials for various types of neural transplant therapy. When neuron precursor cells obtained using the methods of the present invention are used in transplants, preferably 1×10^3 to 1×10^6 neurons, and more preferably 5×10^4 to 6×10^4 neurons, are transplanted. The primary method is

5 stereotaxic surgery in which a cell suspension is transplanted into the brain. In addition, cells may also be transplanted by microsurgery. See, Backlund et al. (Backlund et al. (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73), Lindvall et al. (Lindvall et al. (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68) or Madrazo et al. (Madrazo et al. (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4), for methods of transplanting neuron tissues.

10 Moreover, the cells of the present invention can also be used to isolate genes specific to dopaminergic neuron precursor cells, and genes specific to each stage of the maturation from precursor cells into dopaminergic neurons. They can also be used for searching therapeutic targets for Parkinson's disease, elucidating the maturation process of dopaminergic neurons, and in screenings using maturation as an indicator.

15 <Comparison of Gene Expression Levels>

Postmitotic dopaminergic neuron precursor cells, which were obtained using an antibody of the present invention can be used as a material to isolate genes specifically expressed in these cells. They can also be used to investigate and isolate genes specifically

20 expressed in cells that have differentiated, induced, or proliferated from the dopaminergic neuron precursor cells of the present invention. In addition, they can also be used to investigate genes required for *in vivo* differentiation of dopaminergic neurons, by investigating genes that have different expression levels in cells that have differentiated, induced, or proliferated from the original precursor cells. Since such genes are potential candidates for

25 treating diseases caused by defects in dopaminergic neurons, their determination and isolation are extremely useful.

Comparison of gene expression levels in dopaminergic neuron precursor cells of the present invention with those of cells that have differentiated, induced, or proliferated therefrom, or other cells; or comparison of gene expression levels of the differentiated, induced, or proliferated cells with those of other cells, can be done by commonly used

30 methods, such as cell *in situ* hybridization, Northern blot hybridization, RNA dot blot hybridization, reverse transcription PCR, RNase protection assay, DNA microarray hybridization, serial analysis of gene expression (SAGE) (Velculescu et al. (1995) Science 270: 484-487), subtractive hybridization, and representation difference analysis (RDA)

35 (Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-307).

For cellular *in situ* hybridization, locations where RNA processing, transport, and

localization into the cytoplasm occur in individual cells can be investigated, by hybridizing total RNA or poly A⁺ RNA prepared from cells with a labeling probe specific to a given RNA sequence. In addition, RNA size can be determined by size fraction using gel electrophoresis. Moreover, RNA transcription products can be visualized in situ by using quantitative 5 fluorescent in situ hybridization (FISH) and a digital imaging microscope (Femino et al. (1998) *Science* 280: 585-90), which are applicable to the present invention.

When using reverse transcription PCR for gene expression analysis, the expression of a specific gene can be roughly quantified. Various isoforms of a single RNA transcription product can be also be detected and analyzed using the present method. For reverse 10 transcription PCR, when the reaction is carried out using exon-specific primers, and amplification products other than the predicted product are detected, mRNA isoforms produced by alternative splicing can be identified by analyzing these products. See, for example, the method described in Pykett et al. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3: 559-64, for details. When a quick and rough analysis of expression pattern is demanded, the present method 15 which uses the PCR of the present invention is particularly preferred, in terms of its high speed, high sensitivity, and simplicity.

The efficiency of gene expression screening can be improved by using a DNA chip. Here, a DNA chip refers to a miniature array, in which oligonucleotides, DNA clones, or such, are immobilized at a high density on a support surface such as glass. For example, in order 20 to carry out multiple expression screening, cDNA clones for each gene of interest, or oligonucleotides specific to each gene, are immobilized on a chip to produce a microarray. Next, RNAs are prepared from dopamine-specific neuron precursor cells of the present invention, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom, and treated with reverse transcriptase to yield cDNAs. Next, the resulting cDNA sample is labeled with fluorescent 25 tags or other tags, and then hybridized to the microarray. As a result, genes that are actively expressed in the cells have a higher percentage of the total labeled cDNA, while genes that are not significantly expressed have a lower percentage. Namely, the fluorescent signal intensity which represents hybridization between a labeled cDNA and a cDNA clone or an oligonucleotide on the chip, reflects the expression level of each sequence in the labeled 30 cDNA, and thereby enables the quantification of gene expression.

In addition, multiple genes in dopaminergic neuron precursor cells of the present invention, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom, can be simultaneously analyzed by mRNA differential display, which involves reverse transcription PCR using degenerate PCR primers.

35 First, a modified oligo dT primer is prepared, in which one or two nucleotides at the 3' terminus in the poly A tail of a given mRNA have been altered. Then, a reverse transcription

reaction is carried out using the total RNAs isolated from the precursor cells of the present invention, cells differentiated or proliferated therefrom, or control cells to be used for expression comparison (Liang et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 3269-3275). If the altered nucleotide is a "G", then mRNA having a "C" immediately before the poly A tail can be selectively amplified. If the altered nucleotides are "CA", then mRNA having "TG" immediately before the poly A tail can be selectively amplified. Next, an arbitrary nucleotide sequence of about 10 nucleotides in length is prepared for use as a second primer, and a PCR amplification reaction is carried out using the modified oligo dT primer and this second primer. The amplification product is subjected to size fractionation by electrophoresis using a long 5 polyacrylamide gel. By using such a method, cDNA derived from mRNA specifically expressed in either the cells of the present invention or the control cells can be detected as a band only present in the either sample that has been electrophoresed. This method can also be used to analyze expression of unidentified genes.

10

SAGE analysis does not require a special device for detection, and is one of the 15 preferable analytical methods for simultaneously detecting the expression of a large number of transcription products. First, poly A⁺ RNA is extracted from the dopaminergic neuron precursor cells of the present invention, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom, using standard methods. Next, the RNA is converted into cDNA using a biotinylated oligo (dT) primer, and then treated with a four-base recognizing restriction 20 enzyme (Anchoring Enzyme: AE). Here, the AE-treated fragments contain a biotin group at their 3' terminus. Next, the AE-treated fragments are incubated with streptoavidin for binding. The bound cDNA is divided into two fractions, and each fraction is then linked to a different double-stranded oligonucleotide adapter (linker) A or B. These linkers are composed of: (1) a protruding single strand portion having a sequence complementary to the 25 sequence of the protruding portion formed by the action of the anchoring enzyme, (2) a 5' nucleotide recognizing sequence of the IIS-type restriction enzyme (cleaves at a predetermined location no more than 20 bp away from the recognition site) serving as a tagging enzyme (TE), and (3) an additional sequence of sufficient length for constructing a PCR-specific primer. Here, the linker-linked cDNA is cleaved using the tagging enzyme, and 30 only the linker-linked cDNA sequence portion remains, which is present in the form of a short-strand sequence tag. Next, pools of short-strand sequence tags from the two different types of linkers are linked to each other, followed by PCR amplification using primers specific to linkers A and B. As a result, the amplification product is obtained as a mixture comprising myriad sequences of two adjacent sequence tags (ditags) bound to linkers A and B. The 35 amplification product is treated with the anchoring enzyme, and the free ditag portions are linked into strands in a standard linkage reaction. The amplification product is then cloned.

Determination of the clone's nucleotide sequence can be used to obtain a read-out of consecutive ditags of constant length. The presence of mRNA corresponding to each tag can then be identified once from the determination of the clone's nucleotide sequence and information on the sequence tags thus obtained.

5 Subtraction hybridization is frequently used for cloning a gene with different expression levels in various tissues or cells, and can also be used to clone a gene specifically expressed in dopaminergic neuron precursor cells of the present invention, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom. First, from the aforementioned cells of the present invention, a DNA sample of cells to be tested is prepared (hereinafter referred to as 10 test DNA). Next, DNA of cells to be compared is prepared (hereinafter referred to as driver DNA). The test DNA and the driver DNA can also be used interchangeably. In any case, genes present in the test DNA but not present in the driver DNA are detected. Next, the prepared test DNA is mixed with a large excess of driver DNA, and denatured to form single-stranded DNA, followed by annealing. A specific sequence not present in the driver 15 DNA can be isolated as double-stranded DNA comprising only the test DNA sequence by regulating the annealing conditions. See, Swaroop et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1954 and Yasunaga et al. (1999) Nature Genet. 21: 363-9, for further details on this method.

The RDA method is a method that uses PCR to selectively amplify a sequence of the test DNA that is not present in the driver DNA, and can be similarly used in the present 20 invention like the other previously described methods. See, Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7 and Schutte et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5950-4, for more details on the procedure.

Genes specific to dopaminergic neuron precursor cells, or cells differentiated, induced, or proliferated therefrom, are detected and isolated as described, and can be inserted into 25 vectors or such, for sequence determination and expression analysis using the various known methods described above.

<Screening Using Precursor Cell Maturation as an Index>

The present invention provides a screening method that comprises a step of 30 contacting a test substance with dopaminergic neuron precursor cells of the present invention, and a step of detecting differentiation or proliferation of the precursor cells resulting from that contact. Since compounds obtained by this screening method demonstrate a regulatory function in the differentiation, proliferation, and such, of dopaminergic neurons, they are considered useful as potential therapeutic candidates for diseases caused by defects in 35 dopaminergic neurons.

Here, the "test substance" may be any type of compound, examples of which include

the expression products of gene libraries, synthetic low molecular weight compound libraries, synthetic peptide libraries, antibodies, substances released by bacteria, cell (microbial, plant, or animal) extracts, cell (microbial, plant, or animal) culture supernatants, purified or partially purified polypeptides, marine organisms, plant or animal extracts, soil, random phage peptide display libraries, and such.

Cell differentiation and proliferation can be detected by comparing with the status of the cell in the absence of the test substance. Cell differentiation and proliferation may be detected by morphological observation under a microscope or by detection and quantification of substances produced in cells, such as dopamine.

10

<Analysis of 65B13 Expression Region>

The present invention provides an expression regulatory region of 65B13. An expression regulatory region of the present invention can be cloned from genomic DNA by known methods using a polynucleotide of the present invention. For example, a method for establishing the transcriptional start site, such as the SI mapping method, is known and can be used in the present invention (Cell Engineering, Supplement 8, New Cell Engineering Experiment Protocol, Cancer Research Division, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo ed., Shujunsha Publishing (1993) pp. 362-374). In general, the expression regulatory region of a gene can be cloned by screening a genomic DNA library, using a probe DNA comprising a 15-100 bp segment, and preferably a 30-50 bp segment, of the gene's 5' terminus (in the present invention, all or a portion of nucleotides 1 to 176 of SEQ ID NO: 1, or nucleotides 1 to 126 of SEQ ID NO: 2). A clone obtained in this manner contains a 5' non-coding region of 10 kbp or more, and is shortened or fragmented by exonuclease treatment, or such. Finally, the shortened sequence portion comprising a potential expression regulatory region is evaluated for its expression, strength, regulation, and such, using a reporter gene, thereby making it possible to determine the minimum unit required for maintaining the activity of the 65B13 expression regulatory region of the present invention.

Gene expression regulatory regions can be predicted using a program such as Neural Network (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996)). Moreover, a program for predicting the minimum unit required for the activity of an expression regulatory region is also known, (<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.htm>; Prestridge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-932), and can be used in the present invention.

The expression region of the 65B13 gene isolated in this manner can be used to

produce a protein of interest specific for postmitotic dopaminergic neuron precursor cells *in vivo*.

<Ligand Identification>

5 The present invention provides ligands against the polypeptides of the present invention. The polypeptides of the present invention have a transmembrane domain, and thus are thought to exist embedded within the cell membrane in nature. These polypeptides are believed to be involved in neuron maturation because of their transient expression in dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit. Thus, potential
10 ligands that may demonstrate an agonistic or antagonistic function towards a polypeptide of the present invention may be used for regulating the differentiation of dopaminergic neurons *in vivo, ex vivo, and in vitro*. In identifying a ligand for a polypeptide of the present invention, a polypeptide of the present invention and a candidate compound are first contacted and tested for the presence of binding. In this case, a polypeptide of the present invention
15 can be used when immobilized on a support, or embedded in the cell membrane. There are no particular limitations on the candidate compounds, examples of which include expression products of gene libraries, natural substances derived from marine organisms, extracts of various types of cells, known compounds and peptides, natural substances derived from plants, body tissue extracts, microbial culture supernatants and peptide groups randomly produced by
20 the phage display method (J. Mol. Biol. 222: 301-10 (1991)). In addition, the candidate compound may be labeled for detection of binding.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 shows the cDNA sequence and the amino acid sequence of 65B13-a. The
25 signal sequence and transmembrane domain are underlined.

Fig. 2 shows the cDNA sequence and the amino acid sequence of 65B13-a. The signal sequence and transmembrane domain are underlined. This drawing is a continuation of Fig. 1.

Fig. 3 shows the cDNA sequence and the amino acid sequence of 65B13-b. The
30 signal sequence and transmembrane domain are underlined.

Fig. 4 shows the cDNA sequence and the amino acid sequence of 65B13-b. The signal sequence and transmembrane domain are underlined. This drawing is a continuation of Fig. 3.

Fig. 5 is comparison of the amino acid sequences of 65B13-a and 65B13-b.
35 Fig. 6 is a schematic diagram of 65B13 structure. The shaded areas indicate the transmembrane domain, while Ig represents the Ig domain.

Fig. 7 is a set of photographs showing the results of 65B13 mRNA expression analysis in E12.5 mouse brain by in situ hybridization. A: Sagittal cross-section, B: Parasagittal cross-section, HB: Hindbrain, MB: Midbrain, SC: Spinal cord, CB: Cerebellar primordium.

5 Fig. 8 is a set of photographs showing the results of 65B13 mRNA expression analysis in E12.5 mouse spinal cord by in situ hybridization. A: 65B13, B: NCAM, C: Comparison of the expression regions of 65B13, Ki67, and NCAM (shown as enlarged pictures of framed regions in A and B).

10 Fig. 9 is a set of photographs showing the results of 65B13 mRNA expression analysis in the ventral midbrain region of E12.5 mice, and tyrosine hydroxylase (TH) mRNA expression analysis by in situ hybridization. A: 65B13, B: TH.

Fig. 10 is a schematic diagram showing the expression pattern of 65B13 in the midbrain.

15 Fig. 11 is a schematic diagram showing the 65B13 expression pattern over time. Fig. 12 is a schematic diagram demonstrating the methods for separating and utilizing dopaminergic neuron precursor cells using an anti-65B13 antibody.

Fig. 13 is a photograph showing the expression analysis results of 65B13 (Cy3), Nurr1 (FITC), and TH (Cy5) proteins, by the immunofluorescent staining method using antibodies against each protein.

20 Fig. 14 is a set of graphs showing the flow-cytometric analysis results of detecting 65B13-expressing cells with a 65B13 monoclonal antibody in the (A) ventral midbrain region of E12.5 mouse embryo, and (B) cell populations comprising dopaminergic neuron precursor cells differentiated from ES cells *in vitro*.

25 Best Mode for Carrying Out the Invention

The present invention will be explained in more detail with reference to examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

30 [Example 1] Isolation and Sequence Analysis of a Gene Specific for Dopaminergic Neuron Precursor Cells

To isolate a gene specific to dopaminergic neuron precursor cells, genes with differences in expression were amplified by the subtraction (N-RDA) method using RNA from ventral and dorsal midbrain of E12.5 mice, and sequences of the resulting genes were analyzed.

35

1. N-RDA method

1-1. Adapter preparation

The following oligonucleotides were annealed to each other, and prepared at 100 μ M.
(ad2: ad2S+ad2A, ad3: ad3S+ad3A, ad4: ad4S+ad4A, ad5: ad5S+ad5A, ad13: ad13S+ad13A)
ad2S: cagctccacaacctacatcattccgt (SEQ ID NO:11)
5 ad2A: acggaatgatgt (SEQ ID NO:12)
ad3S: gtccatcttcctctgagactctgg (SEQ ID NO:13)
ad3A: accagagtctca (SEQ ID NO:14)
ad4S: ctgatgggtgtctctgtgagtgt (SEQ ID NO:15)
ad4A: acacactcacag (SEQ ID NO:16)
10 ad5S: ccagccatcgagaatcagtgtacagt (SEQ ID NO:17)
ad5A: actgtcacactg(SEQ ID NO:18)
ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgatcgt(SEQ ID NO:19)
ad13A: acgatcgacagt(SEQ ID NO:20).

15 1-2. cDNA synthesis
Total RNA was prepared from the ventral and dorsal midbrain regions of E12.5 mouse embryos (Japan SLC) using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), and double-stranded cDNA is synthesized using a cDNA Synthesis Kit (Takara). After digestion with restriction enzyme RsaI, ad2 was added. The cDNA was amplified by a 5-minute incubation at 72°C, 15 PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C using ad2S as the primer. In all cases, N-RDA PCR was carried out using a reaction solution containing the following components.
20 10x ExTaq 5 μ l
2.5 mM dNTP 4 μ l
25 ExTaq 0.25 μ l
100 μ M primer 0.5 μ l
cDNA 2 μ l
Distilled water 38.25 μ l

30 1-3. Driver production

The ad2S amplified cDNA was further amplified by incubating at 94°C for 2 minutes, and then performing five PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C. The cDNA was purified using the Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen), and digested with RsaI. 3 μ g was used for each 35 round of subtraction.

1-4. Tester production

The ad2S amplified cDNA was further amplified by incubating at 94°C for 2 minutes, and then performing five PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C. The cDNA was purified using the 5 Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen), and digested with RsaI. ad3 was added to 60 ng of the RsaI-digested cDNA.

1-5. First round of subtraction

The tester and the driver produced in Sections 1-3 and 1-4 above were mixed, ethanol 10 precipitated, and then dissolved in 1 µl of 1x PCR buffer. After a 5-minute incubation at 98°C, 1 µl of 1x PCR buffer + 1M NaCl was added. After another 5 minutes of incubation at 98°C, the tester and the driver were hybridized at 68°C for 16 hours.

With ad3S as the primer, the hybridized cDNA was amplified by incubating at 72°C for 5 minutes, and performing 10 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 15 minutes at 72°C. Next, the amplified cDNA was digested with the Mung Bean Nuclease (Takara) and purified using the Qiaquick PCR Purification Kit. Then, it was amplified by incubating at 94°C for 2 minutes, and performing 13 PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C.

20 1-6. Normalization

1 µl of 2x PCR buffer was added to 8 ng of the cDNA amplified in the first round of subtraction. After incubating at 98°C for 5 minutes, 2 µl of 1x PCR buffer + 1 M NaCl was added. After another 5 minutes of incubation at 98°C, the cDNA was hybridized at 68°C for 16 hours.

25 The hybridized cDNA was digested with RsaI, and purified using the Qiaquick PCR Purification Kit. Then, it was amplified with ad3S as the primer by incubating at 94°C for 2 minutes, and performing 11 PCR cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 2 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C. The PCR product was then digested with RsaI, followed by the addition of ad4.

30

1-7. Second Round of Subtraction

20 ng of cDNA to which ad4 was added in Section 1-6 above was used as the tester and mixed with the driver of 1-3 above, and the same subtraction procedure used in Section 1-5 above was performed. Finally, ad5 was added to the cDNA following RsaI digestion.

35

1-8. Third Round of Subtraction

2 ng of cDNA to which ad5 was added in section 1-7 above was used as the tester and mixed with the driver of 1-3 above, and the same subtraction procedure used in section 1-5 above was carried out. Finally, ad13 was added to the RsaI-digested cDNA.

5 1-9. Fourth Round of Subtraction

2 ng of cDNA to which ad13 was added in section 1-8 above was used as the tester and mixed with the driver of 1-3 above, and the same subtraction procedure used in Section 1-5 above was carried out. The amplified cDNA was cloned into pCRII vector (Invitrogen), and its nucleotide sequence was analyzed using the ABI3100 sequence analyzer.

10 Next, RACE was carried out according to the method described below, using the 65B13 fragment sequence obtained by the N-RDA method.

2. RACE method

15 Total RNA was prepared from the brain of a E12.5 mouse embryo by RNeasy Mini Kit (Qiagen) to prepare mRNA using the μ M ACS mRNA Isolation Kit (Miltenyi Biotec). A cDNA library was then prepared from the prepared mRNA using the Superscript Choice System (Invitrogen) and pCRII vector (Invitrogen). Plasmid DNA was then prepared from this cDNA library. PCR was carried out using the following primers:

TAU2: GGCTTTACACTTATGCTTCCGGCTC (SEQ ID NO:21)
 20 TAU4: CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC (SEQ ID NO:22)
 TAD3: AGGCGATTAAGTTGGTAACGCCAGG (SEQ ID NO:23)
 TAD4: CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG (SEQ ID NO:24)
 65B13 F1: CTTCCCGTATGCTACCTTGTCTCCAC (SEQ ID NO:25)
 65B13 F2: TCCATCTCTCCAAGTGAAGGGTCTTG (SEQ ID NO:26)
 25 65B13 R1: CCAACAGTCCTGCATGCTTGTAAATGA (SEQ ID NO:27)
 65B13 R2: TCCTTCAATGTTCAGTTGGAGGGG (SEQ ID NO:28)

The PCR conditions are indicated below.

1st Round PCR:

30 10x ExTaq 2 μ l
 2.5 mM dNTP 1.6 μ l
 ExTaq 0.1 μ l
 100 μ M TAU2 or TAD3 0.04 μ l
 100 μ M 65B13 F1 or R1 0.2 μ l
 35 cDNA (10 ng/ μ l) 1 μ l
 Distilled water 15.06 μ l

After incubating at 94°C for 5 minutes, 25 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 5 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C were carried out. Next, the second round of PCR was carried out using the 100-fold-diluted product obtained 5 from first round PCR. Conditions for the second round PCR are as shown below.

2nd Round of PCR:

10x ExTaq 5 μ l
2.5 mM dNTP 4 μ l
ExTaq 0.25 μ l
10 100 μ M TAU4 or TAD4 0.1 μ l
100 μ M 65B13 F2 or R2 0.5 μ l
1/100 1st PCR product 1 μ l
Distilled water 15.06 μ l

15 After incubating for 5 minutes at 94°C, 25 cycles of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, and 5 minutes at 72°C, and a final 2-minute incubation at 72°C were carried out. The amplified cDNA fragment was cloned into the pCRII vector and its sequence was analyzed using the ABI3100 sequence analyzer.

20 The nucleotide sequences of the resulting two genes of 65B13-a and 65B13-b are shown as SEQ ID NO: 1 (Figs. 1 and 2) and SEQ ID NO: 2 (Figs. 3 and 4). The coding region of 65B13-a begins at the 177th "A" of SEQ ID NO: 1 and ends with the stop codon at nucleotides 2278 to 2280, yielding a protein comprising 700 amino acids. The 17 amino acid residues encoded by the sequence of nucleotides 177 to 228 is the signal sequence. The 17 amino acid residues encoded by the sequence of nucleotides 1717 to 1767 is the 25 transmembrane domain. In contrast, the coding region of 65B13-b begins at the 127th "A" of SEQ ID NO: 2 and ends at the stop codon of nucleotides 2277 to 2079, yielding a protein comprising 650 amino acids. The 17 amino acid residues encoded by the sequence of nucleotides 127 to 177 is the signal sequence, and the 17 amino acid residues encoded by the sequence of nucleotides 1516 to 1566 is the transmembrane domain. The amino acid 30 sequences encoded by the 65B13-a and 65B13-b genes are shown in SEQ ID NOs: 3 and 4. As shown in Fig. 5, a comparison of the amino acid sequences encoded by both genes revealed that 65B13-a and 65B13-b are isoforms that have resulted from alternative splicing, and that 65B13-b lacks 50 amino acids at the N-terminus compared to 65B13-a. Based on the homology search results, the proteins encoded by the 65B13 genes are believed to be single 35 transmembrane proteins with five Ig domains as shown in Fig. 6.

[Example 2] Expression Analysis of the 65B13 Genes

Next, an expression analysis of these genes by in situ hybridization was carried out according to the following protocol.

First, E12.5 mouse embryos were embedded in O.C.T., and fresh frozen sections of 5 16 μ m thickness were prepared. After drying on a slide glass, the sections were fixed in 4% PFA at room temperature for 30 minutes. After washing with PBS, hybridization was carried out at 65°C for 40 hours (1 μ g/ml DIG-labeled RNA probe, 50% formamide, 5x SSC, 1% SDS, 50 μ g/ml yeast RNA, 50 μ g/ml Heparin). Subsequently, the sections were washed at 65°C 10 (50% formamide, 5x SSC, 1% SDS) and then treated with RNase (5 μ g/ml RNase) at room temperature for 5 minutes. After washing with 0.2x SSC at 65°C and washing with 1x TBST at room temperature, blocking was carried out (Blocking reagent: Roche). The sections were then reacted with alkaline phosphatase-labeled anti-DIG antibody (DAKO), washed (1x TBST, 2 mM Levamisole), and color developed using NBT/BCIP (DAKO) as the substrate.

The expression analysis results of these genes by in situ hybridization showed that 15 65B13 is expressed in the ventral midbrain region, cerebellar primordium, hindbrain, and spinal cord, at the stage E12.5 which corresponds to the time of dopaminergic neuron development (Fig. 7). 65B13 expression in the spinal cord was further compared with those of the growth marker Ki67 and the maturation marker NCAM. In the ventricular zone (VZ) where Ki67-positive neural progenitors proliferate, 65B13 was expressed in some cells. In 20 contrast, 65B13 expression was not observed in the mantle layer (ML), where matured NCAM-positive precursors that have exited from the cell cycle exit (Fig. 8). Similarly in zones outside the spinal cord, expression was observed in some cells within VZ. According to these expression patterns, 65B13 was thought to be expressed transiently in neural precursor cells immediately after cell cycle exit.

25 In the midbrain, expression was only observed in the most ventral region of the ventricular zone. Since tyrosine hydroxylase (TH), a marker gene for dopaminergic neurons, is only expressed in the ML, a comparison of the TH expression and the 65B13 expression showed that both were not expressed in the same cells, however, their expression regions along the dorsal-ventral axis were completely overlapped (Fig. 9). In general, nerve cells 30 present in neural tubes are known to proliferate in the VZ, stop cell division with the commencement of differentiation, and then mature after migrating to the ML, which is just outside of the VZ. Thus, progenitors of dopaminergic neurons are believed to proliferate in the VZ adjacent to the TH expression zone, and express TH after having migrated to the outside following the cell cycle exit. Since this VZ region where these progenitors 35 proliferate overlaps with the 65B13 expression region, 65B13 is thought to express specifically and transiently in dopaminergic neuron precursor cells in the midbrain

immediately after cell cycle exit (Figs. 10 and 11).

[Example 3] Expression Analysis of the 65B13 Proteins

Next, a portion of the 65B13 gene sequence that encodes the extracellular region was 5 used to generate an anti-65B13 antibody to be used for expression analysis by immunohistochemical staining.

First, a partial sequence of the 65B13 gene that encodes the extracellular region was introduced into 293E cells, and the extracellular region of the 65B13 protein was expressed and recovered. After immunizing hamsters with the recovered protein, lymphocytes were 10 extracted and fused with myeloma cells. The fused cells were then transplanted into the abdominal cavities of mice, ascites was obtained, and an anti-65B13 monoclonal antibody was purified. Next, E12.5 mouse embryos were fixed in 4% PFA/PBS(-) at 4°C for 2 hours, and then stood overnight at 4°C in 20% sucrose/PBS(-), followed by O.C.T. embedding. Sections of 12 um thickness were produced. After affixing to slide glasses, the sections were dried for 15 30 minutes at room temperature and then re-moistened with PBS(-). Subsequently, blocking (Block Ace) was carried out at room temperature for 20 minutes. The tissue section glasses were incubated with the generated anti-65B13 monoclonal antibody (10 ug/ml, 2.5% Block Ace/PBS), anti-TH antibody (Chemicon, 0.7 ug/ml, 2.5% Block Ace/PBS), and anti-Nurr1 antibody (Santa Cruz, 4 ug/ml, 2.5% Block Ace/PBS) for 1 hour at room temperature, and 20 overnight at 4°C. The tissue section glasses were then washed four times with 0.1% Triton X-100/PBS(-) at room temperature for 10 minutes each, and incubated with Cy3-labeled anti-hamster IgG antibody, FITC-labeled anti-rabbit IgG antibody, and Cy5-labeled anti-mouse IgG antibody (Jackson, 10 ug/ml, 2.5% Block Ace) at room temperature for 1 hour. The glasses were washed in the same manner, followed by an additional 10-minute wash with 25 PBS(-) at room temperature, and were then embedded.

Similarly to the expression analysis by *in situ* hybridization, expression analysis by immunohistochemical staining using the produced anti-65B13 monoclonal antibody showed that 65B13 was expressed in the ventral midbrain region at E12.5, which corresponds to the time of dopaminergic neuron development (Fig. 13). A comparison of the 65B13 protein 30 expression with those of the dopaminergic neuron markers TH and Nurr1 protein, revealed that 65B13 protein was expressed in the VZ side of the ventral-most region of the midbrain where TH and Nurr1 protein are expressed. Thus, 65B13 protein was thought to express in dopaminergic neuron precursor cells.

35 [Example 4] Detection of 65B13-Expressing Cells by Flow Cytometry

Next, cells that express 65B13 were detected by flow cytometry using an anti-65B13

monoclonal antibody.

First, the ventral midbrain region excised from E12.5 mouse embryos, or cell populations comprising dopaminergic neuron precursor cells that have differentiated from ES cells *in vitro*, were dispersed in a cell dissociation buffer (Invitrogen). Then, the samples 5 were stained for 20 minutes at 4°C with an anti-65B13 monoclonal antibody (10 ug/ml, 1% fetal calf serum, 1 mM EDTA/PBS), without prior fixation or permeation. Subsequently, the samples were washed three times with 1% fetal calf serum and 1 mM EDTA/PBS(-) at 4°C for 3 minutes, stained with PE-labeled anti-hamster IgG antibody (Pharmingen, 4 ug/ml, 1% fetal calf serum, 1 mM EDTA/PBS) at 4°C for 20 minutes, and then washed in the same manner.

10 The 65B13-expressing cells were then detected by flow cytometry.

Populations of cells expressing the 65B13 proteins were detected by flow cytometry using the generated anti-65B13 monoclonal antibody (Fig. 14). Since 65B13-expressing cells can be detected without fixation or permeation, 65B13-expressing cells are believed to be separable as viable cells, by using a flow cytometer equipped with a cell sorter. Since 65B13 15 protein is thought to express in dopaminergic neuron precursor cells, 65B13 is believed to be useful for the separation of dopaminergic neuron precursor cells.

Industrial Applicability

A novel 65B13 gene expressed specifically and transiently in dopaminergic neuron 20 precursor cells immediately after cell cycle exit was obtained according to the present invention. The cellular expression of 65B13 can be used as an indicator in selecting suitable cells to be used in transplant therapy for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, in terms of their safety, survival rate, and network formation ability. In addition, since dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit are selectively 25 obtained, they can be easily differentiated into an appropriate state *in vitro* when used in therapy that require mature cells. Moreover, dopaminergic neuron precursor cells obtained using the genes of the present invention can also be used to isolate genes specifically expressed in these cells. The cells are also thought to be useful in developing pharmaceuticals for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. Since 30 dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit are precursor cells involved in early neuron formation, they are useful in elucidating the neuron maturation process, namely, identifying various factors involved in the maturation process. Elucidation of these factors is expected to contribute greatly to the treatment of neurodegenerative diseases. Moreover, maturation of these cells can be used as an index for screening substances that may 35 regulate (inhibit or promote) the maturation process.

CLAIMS

1. A polynucleotide comprising a sequence selected from the nucleotide sequences of (i) to (iv), wherein the nucleotide sequences encode a 65B13 polypeptide expressed specifically in 5 dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit, or an antigenic fragment thereof,
 - (i) a nucleotide sequence comprising nucleotides 177 to 2280 of SEQ ID NO: 1 or nucleotides 127 to 2079 of SEQ ID NO: 2, or a sequence complementary to either of said nucleotide sequences;
 - 10 (ii) a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4, or a sequence complementary to said nucleotide sequence;
 - (iii) a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence in which a signal sequence portion is deleted in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4, or a sequence complementary to said nucleotide sequence;
 - 15 (iv) a nucleotide sequence encoding an amino acid sequence with a deletion, insertion, substitution, or addition of one or more amino acids in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3 or 4, or a sequence complementary to said nucleotide sequence; and,
 - (v) a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions with the 20 nucleotide sequence of (i).
2. A vector that comprises the polynucleotide of claim 1.
3. A host cell that comprises the polynucleotide of claim 1 or the vector of claim 2.
- 25 4. A polypeptide encoded by the polynucleotide of claim 1.
5. A fragment of the polypeptide of claim 4, comprising at least eight amino acid residues.
- 30 6. An antibody against the polypeptide of claim 4 or the polypeptide fragment of claim 5.
7. A nucleotide chain that encodes the polypeptide fragment of claim 5.
8. A method of selecting a dopaminergic neuron, wherein the method comprises the step of 35 contacting the antibody of claim 6 with a cell sample thought to comprise a dopaminergic neuron precursor cell.

9. A method of selecting a dopaminergic neuron, wherein the method comprises the step of contacting a peptide comprising at least an extracellular portion of the polypeptide of claim 4 with a cell sample thought to comprise a dopaminergic neuron precursor cell.
5
10. A dopaminergic neuron precursor cell immediately after cell cycle exit, wherein the cell is selected using the method of claim 8 or 9.
11. A method of isolating a gene specific to a dopaminergic neuron precursor cell, and a
10 stage-specific gene during maturation of a precursor cell into a dopaminergic neuron, wherein the method comprises the step of detecting and isolating a gene specifically expressed in the precursor cell of claim 10, or a cell differentiated, induced, or proliferated from said precursor cell.
- 15 12. A method of screening using maturation as an index, wherein the method comprises the steps of contacting a test substance with the precursor cell of claim 10, and detecting the differentiation or proliferation of said precursor cell as a result of the contact.

ABSTRACT

A novel gene 65B13 expressed specifically and transiently in dopaminergic neuron precursor cells immediately after cell cycle exit was obtained by the present invention. The 5 cellular expression of 65B13 can be used as an index to select cells that are suitable in terms of their safety, survival rate, and network formation ability, for transplant therapy of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease.

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年5月6日 (06.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/038018 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09,
15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/10,
5/06, C12Q 1/02, G01N 33/48, 33/53

〒600-8385 京都府 京都市 下京区高辻通大宮東入
五坊大宮町90 真徳ハイツ507 Kyoto (JP). 高井 義美
(TAKAI,Yoshimi) [JP/JP]; 〒651-2102 兵庫県 神戸市
西区学園東町2-5-73 Hyogo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013420

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県 土浦市 鈴町 1-1-1 関鉄つくばビル
6階 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2003年10月21日 (21.10.2003)

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-307573
2002年10月22日 (22.10.2002) JP(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒112-8088 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 皆木 康子 (MINAKI,Yasuko) [JP/JP]; 〒606-0806 京都府 京都市 左京区下鴨夢倉町19-3 中川方 Kyoto (JP). 尾野 雄一 (ONO,Yuichi) [JP/JP]; 〒567-0041 大阪府 茨木市 下穂積1-2-30-403 Osaka (JP). 坂本 佳正 (SAKAMOTO,Yoshimasa) [JP/JP]; 〒615-0813 京都府 京都市 右京区西京極町13番地 ラセットアベニュー707 Kyoto (JP). 水原 英理 (MIZUHARA,Eri) [JP/JP]; 〒639-1054 奈良県 大和郡山市 新町305-7 Nara (JP). 中谷 智哉 (NAKATANI,Tomoya) [JP/JP];

WO 2004/038018 A1

(54) Title: GENE EXPRESSED SPECIFICALLY IN DOPAMINE-PRODUCING NEURON PRECURSOR CELLS AFTER TERMINATION OF DIVISION

(54) 発明の名称: 分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現している遺伝子

(57) Abstract: A novel gene 65B13 which is expressed specifically and transiently in dopamine-producing neuron precursor cells immediately after the termination of division. Using the expression of the above 65B13 in cells as an indication, it becomes possible to select cells appropriate for transplantation therapy for neurodegenerative diseases including Parkinson's disease from the viewpoints of safety, survival rate and network formation.

(57) 要約: 本発明により、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する新規遺伝子65B13が得られた。細胞における該65B13の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となった。

- 1 -

明細書

分裂停止後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現している遺伝子

5 技術分野

本発明は、分裂停止後のドーパミン産生ニューロンにおいて発現している新規遺伝子 65B13 に関する。該遺伝子の発現を検出することにより、パーキンソン病 (PD) 等の神経変性疾患の移植治療において用いられるドーパミン産生ニューロン前駆細胞を効率的に分離することができる。

10

背景技術

ドーパミン系は、哺乳動物の脳において重要な運動調節、ホルモン分泌調節、情動調節等に関与する非常に重要な系である。従って、ドーパミン作動性神経伝達における異常は、様々な神経系の障害を引き起こす。例えば、パーキンソン病 (PD) は、中脳黒質のドーパミン産生ニューロンの特異的な脱落が原因で起こる錐体外路系の神経変性疾患である (HARRISON' S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 第 2 卷 第 23 版, Isselbacher et al. 編, McGraw-Hill Inc., NY (1994) pp. 227 5-7)。治療法としては、産生されるドーパミン量の低下を補うために L-DOPA (3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン) を経口投与する方法が主として行われているが、20 効果の持続性が良くないことが知られている。

最近では失われたドーパミン産生ニューロンを補うために、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む 6~9 週齢の中絶胎児の中脳腹側領域を移植する治療法も試みられている (米国特許第 5690927 号; Spencer et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8; Freed et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1549-55; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63; Kordower et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332: 1118-24; Defer et al. (1996) Brain 119: 41-50; Lopez-Loz

ano et al. (1997) *Transp. Proc.* 29: 977-80)。しかし、現在のところ、この方法では細胞の供給面、倫理面(Rosenstain (1995) *Exp. Neurol.* 33: 106; Turner et al. (1993) *Neurosurg.* 33: 1031-7)で問題があると共に、感染汚染の危険性、免疫学的な移植片拒絶(Lopez-Lozano et al. (1997) *Transp. Proc.* 29: 977-80; 5 Widner and Brudin (1988) *Brain Res. Rev.* 13: 287-324)、胎児組織が糖分解よりも脂質代謝に主に依存しているための生存率の低さ(Rosenstein (1995) *Exp. Neurol.* 33: 106)等の様々な面で問題が指摘されている。

倫理面や供給不足の問題を解決するために、例えばブタ由来の皮質、線条、及び中脳細胞を用いる方法等も提案されている(例えば、特表平 10-508487 号公報; 10 特表平 10-508488 号公報; 特表平 10-509034 号公報参照)。この方法においては、細胞表面上の抗原(MHC クラス I 抗原)を改変するという煩雑な操作が必要とされる。そこで、中絶胎児由来の細胞に代えて、胚性幹細胞(ES)細胞、骨髄間質細胞などの非神経系細胞からの *in vitro* におけるドーパミン産生ニューロンの分化系の利用が有望視されている。将来的には ES 細胞若しくは患者本人の持つ神経幹細胞からの再生治療の重要性が増していくものと思われる。移植片拒絶を解消する方法としては、例えば、セルトーリ細胞を同時に移植することにより、局在的に免疫抑制する方法も提案されている(特表平 11-509170 号公報; 特表平 11-501818 号公報; Selawry and Cameron (1993) *Cell Transplant* 2: 123-9)。MHC がマッチする血縁者、他人の骨髄、骨髄バンク、及び臍帯血バンク等から移植細胞を得ることも可能であるが、患者自身の細胞を用いることができれば、余計な操作や手間なしに拒絶反応の問題も解決することができる。

その他、問題となるのは、ニューロン前駆細胞が不均一な細胞集団へと分化する可能性がある点である。パーキンソン病の治療においては、カテコールアミン含有ニューロンの中でもドーパミン産生ニューロンを選択的に移植することが必要である。これまで、パーキンソン病の治療に用いることが提案されている移植細胞としては、線条体(Lindvall et al. (1989) *Arch. Neurol.* 46: 615-31; Wi

dner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63)、ヒト胎児神経由来の不死化セルライン(特表平 8-509215 号公報；特表平 11-506930 号公報；特表 2002-522 070 号公報)、NT2Z 細胞の有糸分裂後ヒトニューロン(特表平 9-5050554 号公報)、ニューロン始原細胞(特表平 11-509729 号公報)、ドーパミン等のカテコールアミンを産生するように外来遺伝子によりトランスフェクトされた細胞、骨髄ストロマ細胞(特表 2002-504503 号公報；特表 2002-513545 号公報)等が挙げられる。しかしながらいずれも、ドーパミン産生ニューロンまたはドーパミン産生ニューロンへと分化する細胞のみを含むものではない。

未分化な細胞集団からドーパミン産生ニューロンを選択的に濃縮・分離する方法としては、ドーパミン産生ニューロンで発現するチロシンヒドロキシラーゼ等の遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を細胞集団の各細胞に導入し、蛍光を発する細胞を分離することにより、ドーパミン産生ニューロンを生きたまま可視化して濃縮・分離、または同定する方法(特開 2002-51775 号公報)が提案されている。この方法は、外来遺伝子の導入という工程を不可欠とするものであり、さらに、遺伝子治療に用いることを目的とする場合、レポーター遺伝子の存在は毒性、免疫原性の面からも問題である。

発明の開示

現時点での PD 移植治療における大きな問題の一つは、中絶胎児の中脳腹側領域あるいは *in vitro* で分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、いずれも多種の細胞の混合物である点である。神経回路形成における安全性を考えると、目的の細胞種のみを分離してから用いるのが望ましく、また腫瘍形成の危険性を考慮すれば、分裂停止後の神経細胞を分離してから使用することが良いと考えられる。さらに、細胞の移植先の脳内での生存や、正しくネットワーク形成する能力を考えると、より早期の前駆細胞を分離することにより治療効果を増大させ得

ると期待される。そこで、本発明者は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子の単離を試みた。

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5
マウス中脳腹側と背側の RNA を用いてサブトラクション法(N-RDA; representation
5 al difference analysis 法; RDA 法(Listsyn NA (1995) Trends Genet. 11:303-7)
を改良(「DNA 断片の量の均一化方法及びサブストラクション法」特願 2001-18475
7 (出願日 2001/6/19))により発現に差のある遺伝子を增幅し、増幅された遺伝子
の配列解析を行った。その結果、新規遺伝子として 65B13 が得られた。該遺伝子
の全長配列を RACE 法により決定した結果、2 つのアルタナティブアイソフォーム
10 が得られ、各々、65B13-a 及び 65B13-b と名付けた。夫々の塩基配列を配列番号:
1 及び 2 として、そして、各塩基配列によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列
を配列番号: 3 及び 4 として記載する(図 1~4)。

そして、これらの遺伝子を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現
解析の結果と、脊髄における増殖マーカーである Ki67 及び成熟マーカーである N
15 CAM と比較した結果得られた発現パターンから、65B13 は分裂停止直後の神経前駆
細胞で一過性に発現するものと考えられた。さらに、中脳での発現をドーパミン
産生ニューロンのマーカー遺伝子であるチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase; TH) の発現と比較したところ背-腹軸方向での発現領域が完全に一致し
ており、65B13 は、中脳では分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞
20 に特異的、且つ一過性に発現すると考えられた(図 10 及び 11)。

また、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果は、抗 65B13 抗体を用いる免疫
染色により裏付けられた(図 13)。さらに、抗 65B13 抗体を用いたフローサイト
メトリーにより 65B13 発現細胞の集団を効率的に分離することができた(図 14)。

上述の結果から、抗 65B13 抗体を用いることにより、中脳腹側領域または *in v*
25 *itro* で分化誘導したドーパミン産生ニューロンを含む培養培地から、65B13 発現
細胞を分離することにより純粋な初期のドーパミンニューロン前駆細胞を得ること

とができるものと考えられる。そして、このようにして得られた細胞は、分裂停止後の前駆細胞のみが分離されたものであり、且つ目的の細胞種のみが分離されていることから、移植治療に用いた場合であっても安全性が高く、また、最も初期の前駆細胞が用いられることから生存率、ネットワーク形成能等の面でも高い
5 治療効果が期待される。また、分裂直後の初期の前駆細胞で最高の治療効果が得られず、細胞を成熟した状態で利用することが求められる場合であっても、本方法により得られた初期の前駆細胞を *in vitro* で最適な分化段階へ培養により成熟させればよいことから、目的とする移植治療に適した分化段階の材料を容易に調製することが可能となる(図 12)。

10 さらに、純粹なドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞及び前駆細胞からニューロンまでの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、PD 治療のターゲット探索等にも有効である。また、本発明の方法により、最も初期の前駆細胞が得られることから、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、成熟を指標としてスクリーニング系等へ利用することもできる。

15 より具体的には、本発明は

[1] 分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B
13 ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする以下の(1)～(4)のヌ
クレオチド配列から選択される配列を含むポリヌクレオチド。

(1)配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、若しくは配列番号:2 の 127 番
20 目から 2079 番目の塩基を含む核酸配列、または該核酸配列に相補的な配
列

(2)配列番号:3 若しくは 4 記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、また
は該核酸配列に相補的な配列

(3)配列番号:3 若しくは 4 記載のアミノ酸配列においてシグナル配列部分を
25 欠く配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(4)配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のア

ミノ酸が欠失、挿入、置換、または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(5) 上記(1)の配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、

- 5 [2] [1]記載のポリヌクレオチドを含むベクター、
[3] [1]記載のポリヌクレオチドまたは[2]記載のベクターを含む宿主細胞、
[4] [1]記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、
[5] [4]記載のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド断片、
- 10 [6] [4]記載のポリペプチド、または[5]記載のポリペプチド断片に対する抗体、
[7] [5]記載のポリペプチド断片をコードするヌクレオチド鎖、
[8] ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、[6]記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、
- 15 [9] ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、[4]記載のポリペプチドの少なくとも細胞外領域部分を含むペプチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、
[10] [8]または[9]記載の方法により選択された分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、
- 20 [11] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、
[10]記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法、並びに
- 25 [12] 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、[10]記載の前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を

検出する工程を含む方法、
に関する。

<ポリヌクレオチド>

5 本発明のポリヌクレオチドは、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する
のに用いることができる抗体を作成する際の抗原を遺伝子工学的手法により得る
際に使用することができる。本発明のポリヌクレオチドは、分裂停止直後のドー
パミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B13 ポリペプチドをコード
する、配列番号:1(図 1 及び 2)の 177 から 2280 番目の塩基、若しくは配列番号:2
10 (図 3 及び 4)の 127 番目から 2079 番目までの塩基を含む核酸配列、または該核酸
配列に相補的な配列を含むものである。

ここで、「ポリヌクレオチド」とは、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ
核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指し、DNA、cDNA、ゲノム DNA、
化学合成 DNA 及び RNA を含む。また、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチ
ジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-0-メチルシチジン、5-カ
ルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチル
ウリジン、ジヒドロウリジン、2'-0-メチルプソイドウリジン、 β -D-ガラクトシ
ルキュエオシン、2'-0-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノ
シン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、
15 1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグ
アノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチ
ルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオ
ウリジン、 β -D-マンノシルキュエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオ
ウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチ
20 ルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9- β -D-リボフラノシル-2-メチルリ
オプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-
25

6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエス
テル、ウリジン-5 オキシ酢酸、ワイトキソシン、プロイドウリジン、キュエオ
シン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリ
ジン、5-メチルウリジン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイ
ル)トレオニン、2'-0-メチル-5-メチルウリジン、2'-0-メチルウリジン、ワイ
プトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含むポ
リヌクレオチドも包含する。

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、分裂停止直後のドーパミン産生ニュー
ロン前駆細胞に特異的に発現する 65B13 ポリペプチドをコードする、配列番号 3:
10 若しくは 4(各々図 1、2 若しくは図 3、4、または図 5 参照)記載のアミノ酸配列を
コードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。このようなアミ
ノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号:1 及び 2 に記載された核酸配列に加
えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号:1 及び 2 記載の配列とは異なる核酸配列
を含むものである。本発明のポリヌクレオチドを遺伝子工学的な手法によりポリ
15 ペプチドを発現させるのに用いる場合、使用する宿主のコドン使用頻度を考慮し
て、発現効率の高いヌクレオチド配列を選択し、設計することができる(Grantham
et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: 43-74)。本発明のポリヌクレオチドはま
た、配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において、シグナル配列部分を欠く
配列をコードする核酸配列を含むものを包含する。配列番号:3 及び 4 記載のアミ
20 ノ酸配列では、最初の 17 アミノ酸残基がシグナル配列に該当する。

本発明のポリヌクレオチドは、さらに、分裂停止直後のドーパミン産生ニュー
ロン前駆細胞に特異的に発現する 65B13 ポリペプチド、またはその抗原性断片を
コードする、配列番号:3 若しくは 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個の
アミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配
25 列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。1 若しくは複数個のアミノ酸が欠
失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元

のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である (Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dahlbäck-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。

5 ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により本発明のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を改変する場合、蛋白質の機能を保持する必要がある場合には、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコードするように配列10 を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸(Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸(Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, His, Lys)、中性アミノ酸(Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸(Ala, Gly)、分枝アミノ酸(Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸(Ser, Thr)、アミド型アミノ酸(Gln, Asn)、含硫アミノ酸(Cys, Met)、芳香族アミノ酸(His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸(His, Trp)、イミノ酸(Pro, 4Hyp)等に分類することができる。中でも、Ala、Val、Leu 及び Ile の間、Ser 及び Thr の間、Asp 及び Glu の間、Asn 及び Gln の間、Lys 及び Arg の間、Phe 及び Tyr の間の置換は、蛋白質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数及び部位は特に制限されず、該ポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸が 65B13 の抗原性を有していれば良い。

20 このような配列番号:3 または 4 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特に Section 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995)

Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6 等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

5 さらに、本発明のポリヌクレオチドは、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B13 ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする、配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、若しくは配列番号:2 の 127 番目から 2079 番目の塩基を含む核酸配列または該核酸配列に相補的な配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、を含むポリヌク
10 レオチドである。本発明の実施例では、配列番号:1 及び 2 記載の 2 種類の配列を有する 65B13 のアイソフォームが得られているが、その他にもアルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が存在する可能性があり、そのようなアイソフォームやアレリック変異体も本発明のポリペプチドに含まれる。このようなポリヌクレオチドは、配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、または配列番号:
15 2 の 127 番目から 2079 番目の塩基を含む核酸配列からなるポリヌクレオチドをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、ブラークハイブリダイゼーション、サザンプロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物の cDNA ライブライアリーやゲノムライブライアリーカラ得ることができる。cDNA ライブライアリーカの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参考することができる。また、市販の cDNA ライブライアリーやゲノムライブライアリーカ用いてもよい。

20 より具体的に、cDNA ライブライアリーカの作製においては、まず、本発明のポリヌクレオチドを発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC 法(Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9)等の公知の手法により全 RNA を調製し、mRNA Purific
25

ation Kit (Pharmacia) 等を用いて mRNA を精製する。QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) のような、直接 mRNA を調製するためのキットを利用してもよい。次に得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業) のような cDNA 合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNA は PCR を利用した 5' -RACE 法 (Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32) により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高い cDNA ライブライマーを作製するために、オリゴキヤップ法 (Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56) 等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られた cDNA は、適当なベクター中に組み込む。

本発明におけるハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、50°C」、「2×SSC、0.1% SDS、42°C」、「1×SSC、0.1% SDS、37°C」、よりストリンジエントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1% SDS、65°C」、「0.5×SSC、0.1% SDS、42°C」、「0.2×SSC、0.1% SDS、65°C」等の条件を挙げができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer (Amersham Life Science) を用いた方法として、68°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68°Cに保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1% SDS 中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS 中、37°Cで20分の洗浄を3回、最後に、1×SSC、0.1% SDS 中、50°Cで20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えば Expresshyb Hybridization Solution (CLONTECH) 中、55°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37~55°Cで1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1% SDS 中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1% SDS 中、37°Cで20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジエントな条件とすることができ

る。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を 60°C、さらにストリンジエントな条件としては 68°C とすることができます。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、本発明の実施例において得られたマウス 65B13 のアイソフォーム、アレリック変異体、及び対応する他種生物由来の遺伝子を得るための条件を設定することができる。

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特に Section 9. 47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特に Section 6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995);条件については特に Section 2.10)等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、または配列番号:2 の 127 番目から 2079 番目の塩基を含む核酸配列に対して少なくとも 50% 以上、好ましくは 70%、さらに好ましくは 80%、より一層好ましくは 90% (例えば、95% 以上、さらには 99%) の同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、BLAST アルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいたプログラムとして、アミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしては BLASTX、ヌクレオチド配列については BLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、本発明の配列に対して使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 等を参照することができる。

その他、遺伝子增幅技術(PCR) (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、65B13 のアイソフォームやア

レリック変異体等、65B13 と類似した構造及び機能を有する遺伝子を、配列番号: 1 及び 2 に記載のヌクレオチド配列を基にプライマーを設計し、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物の cDNA ライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。

5 例えば、BLAST サーチの結果、本発明のマウス 65B13 のヌクレオチド配列に対して 84% の同一性を有する 3 つの機能不明のヒト配列 (GenBank Accession No.: XM_048304, AL136654, BC007312; 各ヌクレオチド配列を配列番号: 5, 7, 9、また該ヌクレオチド配列から予測されるアミノ酸配列を配列番号: 6, 8, 10 として記載する) は、マウス 65B13 に対するヒトホモログであると考えられる。このようなヒトホモログは、本発明の方法により、ヒトドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択に使用することができる。これらの配列は、記録されている情報から、全て第 19 染色体上の同じ遺伝子由来の配列と考えられる。そのうち、配列番号: 7 10 に示す AL136654 と配列番号: 9 に示す BC007312 の 2 つは cDNA 断片であり、もう一つの配列番号: 5 に示す XM_048304 は、ゲノム配列から予測された mRNA 配列と 15 考えられた。これらの予測配列には、本発明の 65B13 とほぼ同じ大きさの ORF があり、予測されたアミノ酸配列の 65B13 との同一性は 84% であった。

本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法 (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463) 20 等により行うことができる。また、適当な DNA シークエンサーを利用して配列を解析することも可能である。

<ヌクレオチド鎖>

さらに、本発明により、本発明のポリヌクレオチドに相補的な、少なくとも 15 25 塩基からなるヌクレオチド鎖が提供される。ここで「相補的な配列」とは、ヌクレオチド配列中の少なくとも 15 個の連続した塩基が鑄型に対して完全に対になっ

ている場合のみならず、そのうちの少なくとも 70%、好ましくは 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上 (例えば、97% または 99%) が対になつているものも含む。対になっているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中の A に対し T (RNA の場合は U)、T または U に対し A、C に対し G、そして G に 5 対し C が対応して鎖が形成されていることを意味する。そして相同性は、上述のハイブリダイズするポリヌクレオチドの場合と同様の方法で決定することができる。

このような本発明のヌクレオチド鎖は、本発明のポリヌクレオチドを検出または単離するためのプローブ、增幅するためのプライマーとして利用することができる。通常、プローブとして使用する場合には 15~100、好ましくは 15~35 個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも 15、好ましくは 30 個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3' 末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5' 末端側には制限酵素認識配列、タグ等を付加した形態に設計することができる。 10 本発明のヌクレオチド鎖は、本発明のポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができる。さらに、これらのプローブまたはプライマーを用いて、細胞内における本発明のポリヌクレオチドの変異を検出することができる。このような変異は、場合により本発明のポリペプチドの活性、または発現の異常を引き起こすものであることから、疾病の診断等に有用と考えられる。 15

また、本発明のヌクレオチド鎖には、本発明のポリヌクレオチドの細胞内における発現を mRNA または DNA に対して結合することにより抑制するアンチセンス核酸、及び、mRNA を特異的に開裂することにより阻止するリボザイムが含まれる。 20

アンチセンスが標的遺伝子の発現抑制作用の機構としては、(1) 3 重鎖形成による転写開始阻害、(2) RNA ポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3) 合成中の RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、(4) イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によ 25

るスプライシング抑制、(5)スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNA とのハイブリッド形成による、mRNA の細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリ A 付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA 翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生化学実験講座 2 核酸 IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp. 319-347 (1993))。

10 本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸は、上述の(1)～(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードする DNA は、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、
15 標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸としては、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp 以上、さらに好ましくは 500bp 以上であり通常 3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内、より好ましくは 1000bp 以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、本発明のポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21)等により調製することができる。

20 25

リボザイムとは、RNA を構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)及びスマールリボザイム(small ribozyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に 5' -リン酸と 3' -ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さら

に(1)グアノシンによる 5' -スプライス部位でのトランスエステル化反応を行う
グループ I イントロン RNA、(2)自己スプライシングをラリアット構造を経る二段
階反応で行うグループ II イントロン RNA、及び(3)加水分解反応による tRNA 前駆
体を 5' 側で切断するリボヌクレアーゼ P の RNA 成分に分類される。それに対し
5 て、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp 程度)であり、RNA を切
断して、5' -ヒドロキシル基と 2' -3' 環状リン酸を生じさせる。スモールリボ
ザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225)、
ヘアピン型(Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucl
eic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが
10 含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知で
あり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くの RNA 配列と相補的と
なるように設計することにより、標的 RNA 中の塩基配列 UC、UU または UA を認識
して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al.
15 (1988) FEBS Lett. 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990)蛋白質核酸酵素 35: 21
91; Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059)。ヘアピン型のリボ
ザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sa
saki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)。

本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞
内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、
20 アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リポソーム等を利用した非ウ
イルスベクター、または naked DNA として *ex vivo* 法または *in vivo* 法により遺
伝子治療に用いることもできる。

本発明のヌクレオチド鎖の塩基配列の確認は、上述のポリヌクレオチドと同様
の方法により行うことができる。

本発明により、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。本発明のベクターは、本発明のポリヌクレオチドを宿主細胞内に保持したり、該ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを発現させたりするのに有用である。

本ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターが含まれる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。好ましい態様においては、ベクターを導入した宿主細胞内で本発明のポリヌクレオチドが発現されるように制御配列下に結合する。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソーム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスクレッセーター、転写因子、転写物を安定化するポリAシグナル、スプライシング及びポリアデニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。また、本発明のベクターは、好ましくは選択可能なマーカーを含む。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。このようなシグナルペプチドは、天然において 65B13 に付加している 17 アミノ酸残基からなる、または異種蛋白質由来のシグナルペプチドであってもよい。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAG または TGA)の挿入を行ってもよい。

本発明のベクターは、好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、*in vitro* で、目的とする宿主細胞内で発現ベクター中にコードされるポリペプチドを発現することができる構築物を指す。クローニングベクター、バイナリーベクター、インテグレイティングベクター等が本発明の発現ベクターに含まれる。

発現の過程には、発現ベクター中のコード配列の翻訳可能な mRNA への転写、及び mRNA から本発明のポリペプチドへの翻訳、さらに場合によっては発現されたポリペプチドの小胞体内腔、ペリプラズムまたは細胞外への分泌が含まれる。

5 *in vitro* におけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBEST (Promega) を例示することができる。また、*E. coli* 等の原核細胞宿主における発現を可能にするプロモーターとしては P_L 、*araB* (Better et al. (1988) Science 240: 1041-3)、*lacZ* (Ward et al. (1989) Nature 341: 544-6; Ward et al. (1992) FASEB J. 6: 2422-7)、*trp*、*tac*、*trc* (*lac* と *trp* の融合) 等のプロモーターが挙げられる。また、*trpA* 由来、ファージ由来、*rrnB* リポソーマル RNA 由来ターミネーターが、利用可能である。さらに、大腸菌用のベクターは、好ましくはベクターを宿主内で増幅するための「*ori*」、及び形質転換された宿主を選抜するためのマーカー遺伝子を持つ。アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、及びクロラムフェニコール等の薬剤により宿主の判別を行うことを可能にする薬剤耐性遺伝子の使用が好ましい。特に、ポリペプチドをペリプラズムへ分泌させることを目的とする場合、*pelB* シグナル配列 (Lei et al. (1987) J. Bacteriol. 169: 4379) を使用することができる。例えば、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pCR-Script、pGEX-5X-1 (Pharmacia)、pEGFP、pBluescript (Stratagene)、pET (Invitrogen; この場合の宿主は T7 ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい) 等のベクターを挙げることができる。また、特にサブクローニングまたは切出し用のベクターとしては、pGEM-T、pDIRECT、pT7 等を例示できる。

20 大腸菌以外の細菌宿主用としては、バチルス属のものが挙げられ、pUB110 系、pc194 系のベクターが例示される。より具体的に、枯草菌由来の pPL608、pKTH50 等を挙げることができる。その他、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas cepacia* 等のシュードモナス属、*Brevibacterium lactofermentum* 等のプレビバクテリウム属 (pAJ43 (Gene 39: 281 (1985)) 等)、*Corynebacterium glutamicum* 等のコリネバクテリウム属 (pCS11 (特開昭 57-183799 号公報; pCB101 (Mol. Gen. Genet. 196:

175 (1984))等)、ストレプトコッカス属(pHV1301(FEMS Microbiol. Lett. 26: 2
39 (1985))、pGK1(Appl. Environ. Microbiol. 50: 94 (1985))等)、ラクトバチ
ルス属(pAM β 1(J. Bacteriol. 137: 614 (1979))等)、*Rhodococcus rhodochrous*
等のロドコッカス属(J. Gen. Microbiol. 138: 1003 (1992))、*Streptomyces liv*
5 *idans*、*Streptomyces virginiae*等のストレプトマイセス属(Genetic Manipulat
ion of Streptomyces: A Laboratory Manual, Hopwood et al., Cold Spring Har
bor Laboratories (1985)参照;pIJ486(Mol. Gen. Genet. 203: 468-78 (1986))、
pKC1064(Gene 103: 97-9 (1991))、pUWL-KS(Gene 165: 149-50 (1995)))の細菌を
宿主とするベクター系が開発されている。微生物を宿主として利用できるベクタ
10 ーについては、『微生物学基礎講座 8 遺伝子工学』(共立出版)等の文献を参照す
ることができる。ベクターを細菌宿主へ導入するための手法としては、塩化カル
シウム法(Mandel and Higa (1970) J. Mol. Biol. 53: 158-62; Hanahan (1983)
J. Mol. Biol. 166: 557-80)、エレクトポレーション法等を採用することができ
る。

15 また、真核細胞宿主での発現を可能にする調節要素は、酵母を宿主とする場合
には、AOX1 及び GAL1 プロモーターが例示される。酵母由来の発現ベクターとし
ては、Pichia Expression Kit (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01 等が例示できる。
酵母で利用可能なベクターに関しては、Adv. Biochem. Eng. 43: 75-102 (1990)、
Yeast 8: 423-88 (1992)等に詳述されている。より具体的には、*Saccharomyces c*
20 *erevisiae*等のサッカロマイセス属では、YRp 系、YEp 系、YCP 系、及び YIp 系ベ
クターが利用可能である。特に、多コピーの遺伝子導入が可能であり、安定に遺
伝子を保持できるインテグレーションベクター(EP537456 等)が有用である。その
他、*Kluyveromyces lactis*等のクルイベロマイセス属では、*S. cerevisiae*由来 2
μm 系ベクター、pKD1 系ベクター(J. Bacteriol. 145: 382-90 (1981))、pGK11
25 由来ベクター、クライベロマイセス自律増殖遺伝子 KARS 系ベクター等、シゾサッ
カロマイセス属では、Mol. Cell. Biol. 6: 80 (1986)に記載のベクター、pAUR22

4(宝酒造)、チゴサッカロマイセスでは pSB3(Nucleic Acids Res. 13: 4267 (1985))由来ベクター、*Pichia angusta*、*Pichia pastoris* 等のピキア属では Yeast 7: 431-43 (1991)、Mol. Cell. Biol. 5: 3376 (1985)、Nucleic Acids Res. 15: 3 859 (1987) 等の文献記載のベクター、*Candida maltosa*、*C. albicans*、*C. tropicalis*、*C. utilis* 等のキャンディダ属では、特開平 8-173170 号公報記載のベクター、また *C. maltosa* 由来の ARS(Agri. Biol. Chem. 51: 1587 (1987))を利用したベクター、*Aspergillus niger*、*A. oryzae* 等のアスペルギルス属では、Trends in Biotechnology 7: 283-7 (1989) 記載のベクター、トリコデルマ属では菌体外セルラーゼ遺伝子由来プロモーター(Bio/Technology 7: 596-603 (1989))を利用したベクターが利用できる。

哺乳動物及びその他の動物細胞を宿主とする場合には、アデノウイルス late プロモーター(Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946)、CAG プロモーター(Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200)、CMV immediate early プロモーター(Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9)、EF1 α プロモーター(Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 5322; Kim et al. (1990) Gene 91: 217-23)、HSV TK プロモーター、SR α プロモーター(Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466)、SV40 プロモーター(Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108)、SV40 early プロモーター(Genetic Engineering Vol. 3, Williamson ed., Academic Press (1982) pp. 83-141)、SV40 late プロモーター(Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94)、RSV(ラウス肉腫ウイルス)-LTR プロモーター(Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704)、MMLV-LTR プロモーター、CMV エンハンサー、SV40 エンハンサー、及びグロビンイントロン等を使用することができる。さらに、ネオマイシン、G418 等の薬剤による判別を可能とする薬剤耐性遺伝子がベクターに含まれていることが好ましい。そして、細胞内で遺伝子のコピー数の増加を計る場合には、例えば核酸合成経路を欠損した CHO を宿主とし、その欠損を補う DHFR 遺伝子を有する pCHOI 等のベク

ターを採用し、メトトレキセト(MTX)によりコピー数を増幅させることができる。一方、遺伝子の一過性発現のためには、SV40のT抗原遺伝子を染色体上に有するCOS細胞を宿主とし、pcD等のSV40の複製起点、またはアデノウイルス、ウシパピローマウイルス(BPV)、ポリオーマウイルス等の複製開始点を持つベクターを5 使用することができる。さらに、遺伝子コピー数の増幅のための選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)、チミジンキナーゼ(TK)、キサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)等をコードする遺伝子を含んでもよい。適当なベクターとして、例えば、Okayama-Bergの発現ベクターpcDV1(Pharmacia)、pCDM8(Nature 329: 840-2 10 (1987))、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3(Invitrogen)、pSPORT1(GIBCO BRL)、pSV2dhfr(Mol. Cell. Biol. 1: 854-64 (1981))、pEF-BOS(Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990))、pCEP4(Invitrogen)、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13、pME18S(Mol. Cell. Biol. 8: 466-72 (1988))等が公知である。

特に動物の生体内において本発明のポリヌクレオチドを発現させるためには、p 15 Adexlcw等のアデノウイルスベクター、pZIPneo等のレトロウイルスベクターが挙げられる。ベクターはアデノウイルス法、エレクトポレーション(電気穿孔)法(Cytotechnology 3: 133 (1990))、カチオニックリポソーム法(カチオニックリポソーム DOTAP(Boehringer Mannheim)等)、正電荷ポリマーによる導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)法、内包型リポソーム(internal type liposome)法、パーティクルガンを用いる方法、リポソーム法、リポフェクション(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987))、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、レセプター介在遺伝子導入法、レトロウイルス法、DEAE デキストラン法、ウイルス-リポソーム法(別冊実験医学『遺伝子治療の基礎技術』羊土社(1997);別冊実験医学『遺伝子導入&発現解析実験法』羊土社(1997); J. Clin. Invest. 93: 1458-64 (1994); Am. J. Physiol. 271: R1212-20 (1996); Molecular Medicine 30: 1440-8 (1993); 実験医学 12: 1822-6 (1994); 蛋白質核酸酵素 42: 20

1806-13 (1997); *Circulation* 92(Suppl. II): 479-82 (1995))、naked-DNAの直
接導入法等により宿主に導入することができる。アデノウイルス及びレトロウイ
ルス以外由来のウイルスベクター、例えば、アデノ隨伴ウイルス、シンビスウイ
ルス、センダイウイルス、トガウイルス、パラミクソウイルス、ポックスウイル
5 ルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス
等を元に作製されたベクターを利用することもできる。生体内への投与は、*ex vi
vo* 法でも *in vivo* 法で行ってもよい。

その他、昆虫発現システムも異種ポリペプチドを発現させる系として知られて
おり、例えば、*Autographa californica* 核ポリヘドロシスウイルス(AcNPV)をベク
10 ターとし、*Spodoptera frugiperda* 細胞、または *Trichoplusia larvae* 細胞中で
外来遺伝子を発現させることができる。この際、目的とする外来遺伝子は、ウイ
ルスの非必須領域にクローニングする。例えば、ポリヘドリンプロモーター制御
下に連結してもよい。この場合、ポリヘドリン遺伝子は不活性化され、コート蛋白
質を欠く組換えウイルスが產生され、該ウイルスに感染した *Spodoptera frugipe
rda* または *Trichoplusia larvae* 等の細胞中で目的とするポリペプチドが発現さ
れる(Smith (1983) *J. Virol.* 46: 584; Engelhard (1994) *Proc. Natl. Acad. S
ci. USA* 91: 3224-7)。その他、昆虫細胞由来の発現ベクターとして、Bac-to-BAC
15 *baculovirus expression system*(Bigco BRL)、pBacPAK8 等も公知である。

植物細胞を宿主とする場合には、例えばカリフラワーモザイクウイルスの 35S
20 プロモーター等を利用したベクターが使用可能である。植物細胞へのベクターの
導入法としては、PEG 法、エレクトポーレーション法、アグロバクテリウム法、パ
ーティクルガン法等が公知である。

ベクターへの DNA の挿入は、制限酵素サイトを利用したリガーゼ反応により行
うことができる(*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons
25 (1987) Section 11.4-11.11; *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 2nd ed.,
Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。

<宿主>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主が提供される。本発明のポリペプチドの製造には、*in vitro* 及び *in vivo* の產生系が考えられる。本発明の宿主には、古細菌、細菌、真菌類、植物、昆虫、魚類、両生類、
5 ハ虫類、鳥類、哺乳類由来の原核及び真核細胞が含まれる。本発明の宿主は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に含むものである。該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になければよく、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み
10 込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

細菌宿主としては、*E. coli*(JM109, DH5 α , HB101, XL1Blue)、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*等、エシエリシア属、ストレプトコッカス属、スタフ
イロコッカス属、セラチア属、バシリス属等に属するのグラム陽性及びグラム陰
性細菌を例示することができる。

15 真核宿主には、酵母等の真菌類、高等植物(*Nicotiana tabacum* 由来細胞)、昆
虫(ドロソフィラ S2、スポロドプテラ Sf9、Sf21、Tn5)、魚類、両生類(アフリカ
ツメガエル卵母細胞(Valle et al. (1981) *Nature* 291: 358-40))、ハ虫類、鳥類、
哺乳類(CHO(J. Exp. Med. 108: 945 (1995); 中でも DHFR 遺伝子欠損 dhfr-CHO (P
roc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20 (1980) 及び CHO K-1(Proc. Natl. Acad.
20 Sci. USA 60: 1275 (1968))が好適である)、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK29
3、Bowes メラノーマ細胞)、ミエローマ、Vero、Namalwa、Namalwa KJM-1、HBT56
37(特開昭 63-299 号公報))、植物(ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、ア
ブラナ、ダイズ、トマト、コムギ、オオムギ、ライ麦、アルファルファ、亜麻等)
等の細胞が含まれる。真菌類としては、*Saccharomyces* 属に属する *Saccharomyces*
25 *cerevisiae*、*Pichia* 属等の酵母に加えて、糸状菌の *Aspergillus* 属の *Aspergillus*
us niger 等の細胞を宿主とした発現系も公知である。

宿主細胞へのベクターの導入は、エレクトポレーション法(Chu et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15: 1311-26)、カチオニックリポソーム法、電気パルス穿孔法(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 9.1-9.9)、微小ガラス管を使用した直接注入法、マイクロインジェクション法、
5 リポフェクション(Derijard (1994) Cell 7: 1025-37; Lamb (1993) Nature Genetics 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) Science 259: 230-4)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL)、リン酸カルシウム法(Chen and Okayama (1987) Mol. Cell. Biol. 7: 2745-52)、DEAE デキストラン法(Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussman and Milman (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 1642-3)、
10 FuGene6 試薬(Boehringer-Mannheim)等により行い得る。

<ポリペプチド及びその断片>

本発明の「ポリペプチド」は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされる
15 ペプチド重合体である。配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列を有する蛋白質
を好みの例として挙げることができる。本発明のポリペプチドを構成するアミ
ノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。アミ
ノ酸残基の修飾としては、アシル化、アセチル化、アミド化、アルギニル化、GPI
アンカー形成、架橋、 γ -カルボキシル化、環化、共有架橋の形成、グリコシル化、
20 酸化、脂質または脂肪誘導体の共有結合化、シスチンの形成、ジスルフィド結合
の形成、セレノイル化、脱メチル化、蛋白質の分解処理、スクレオチドまたはヌ
クレオチド誘導体の共有結合化、ヒドロキシル化、ピログルタメートの形成、フ
ラビンの共有結合化、プレニル化、ヘム部分の共有結合化、ホスファチジルイノ
シトールの共有結合化、ホルミル化、ミリストイル化、メチル化、ユピキチン化、
ヨウ素化、ラセミ化、ADP-リボシル化、硫酸化、リン酸化等が例示される。さら
25 に、本発明のポリペプチドにはシグナルペプチド部分がついた前駆体、シグナル
ペプチド部分を欠く成熟蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融

合蛋白質を含む。本発明のポリペプチドに付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合蛋白質(MBP)、免疫グロブリン定常領域、 α -チューブリン断片、 β -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Tehcnol. 6: 1204-10)、lckタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10蛋白質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質)等の蛋白質の精製を容易にする配列(例えば、pcDNA3.1/Myc-His(Invitrogen)のようなベクターを利用できる)、組換え技術により蛋白質を生産する際に安定性を付与する配列等を選択することができる。

さらに、本発明により本発明のポリペプチドの断片が提供される。本発明のポリペプチド断片は、本発明のポリペプチドの一部と同一であり、少なくとも8アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片である。特に好ましい断片としては、アミノ末端、カルボキシル末端、膜貫通ドメインを欠失したポリペプチド断片を挙げることができる。 α ヘリックス及び α ヘリックス形成領域、 α 両親媒性領域、 β シート及び β シート形成領域、 β 両親媒性領域、基質結合領域、高抗原指数領域、コイル及びコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、ターン及びターン形成領域、並びに表面形成領域を含む断片が本発明のポリペプチド断片に含まれる。本発明のポリペプチド断片は、本発明のポリペプチドの抗原性さえ有すればどのような断片であってもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性/親水性を解析する方法(Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22)、二次構造を解析する方法(Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 251-76)により推定し、さらにコンピュータープログラム(Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認するPEPSCAN法(特表昭60-500684号

公報)等により確認することができる。

本発明のポリペプチド、及びポリペプチド断片は公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することができる。遺伝子組換え技術により本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片を製造する場合、製造される蛋白質は、選択する宿主の種類によってグリコシル化を受ける場合と受けない場合、さらに分子量、等電点等が異なる場合がある。通常、大腸菌等の原核細胞を宿主としてポリペプチドを発現させた場合、得られるポリペプチドは本来ポリペプチドが有していたN-末端にメチオニン残基が付加された形で產生される。このような宿主の違いにより、構造の異なるポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。

<ポリペプチドの製造>

*in vitro*でポリペプチドを製造する場合、*in vitro*トランスレーション(Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44)等の方法に従って、細胞を含まない試験管内の系でポリペプチドを製造することができる。それに対して、細胞を用いてポリペプチドを製造する場合、まず、上述の中から適当な宿主細胞を選択し、目的とするDNAによる形質転換を行う。続いて形質転換された細胞を培養することにより所望のポリペプチドを得ることができる。培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には、DME M (Virology 8: 396 (1959)、MEM(Science 122: 501 (1952))、RPMI1640(J. Am. Med. Assoc. 199: 519 (1967))、199(Proc. Soc. Biol. Med. 73: 1 (1950))、IMDM等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清を添加し、pH 約 6~8、30~40℃において15~200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

一方、*in vivo*におけるポリペプチドの生産系を確立するためには、動物または植物へ目的とするDNAを導入し、生体内においてポリペプチドを產生させる。

ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシ等の哺乳動物、カイコ等の昆虫(Susumu (1985) *Nature* 315: 592-4)等の動物系が公知である(Lubon (1998) *Biotechnol. Annu. Rev.* 4: 1-54)。また、哺乳動物系においてトランスジェニック動物を用いることもできる。

5 例えば、所望のポリペプチドをヤギの乳汁中に分泌させることを目的とする場合、該ポリペプチドをコードするDNAを β カゼイン等の乳汁中に特異的分泌される蛋白質をコードするDNAと結合し、目的ポリペプチドを融合蛋白質として発現させるようとする。次に、融合蛋白質をコードするDNAをヤギの胚へ導入する。DNAを導入した胚を雌ヤギの子宮へ移植する。このヤギから生まれるトランスジェニックヤギ、またはその子孫は乳汁中に所望のポリペプチドを分泌する。必要に応じ、乳汁量を増やすため、ホルモンを投与することもできる(Ebert et al. (1994) *Bio/Technology* 12: 699-702)。

タバコ等の植物を用いたトランスジェニック植物のポリペプチド産生系が公知である。まず、所望のポリペプチドコードDNAをpMON530等の植物発現に適したベクターに組み込み、*Agrobacterium tumefaciens*等の細菌に導入する。DNAの導入された細菌を*Nicotina tabacum*等の植物に感染させ、植物を再生させることにより、所望のポリペプチドを得られたトランスジェニック植物の葉より単離することができる(Julian et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24: 131-8)。その他の方法としては、PEGを用いプロトプラストへDNAを導入して植物体を再生する方法(Gene Transfer to Plants, Potrykus and Spangenberg ed. (1995) pp. 66-74; インド型イネ品種に適する)、電気パルスによりプロトプラストへDNAを導入して植物体を再生する方法(Toki et al. (1992) *Plant Physiol.* 100: 1503-7; 日本型イネに適する)、パーティクルガン法で植物細胞に直接DNAを導入し植物体を再生する方法(Christou et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 957-62)、アグロバクテリウムを介し細胞にDNAを導入し植物体を再生する方法(Hiei et al. (1994) *Plant J.* 6: 271-82)等が確立されている。植物を再生する方法については、Toki et al.

(1995) *Plant Physiol.* 100: 1503-7 を参照することができる。

トランスジェニック植物が一度得られた後は、さらに該植物の種子、果実、塊茎、塊根、株、切穂、カルス、プロトプラスト等を材料として同じように本発明のポリペプチドを産生する植物宿主を繁殖させ得ることができる。

5 通常、遺伝子組換え技術により製造された本発明のポリペプチドは、まず、ポリペプチドが細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物を回収する。そして、蛋白質の精製方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲルfiltration、限外filtration、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、
10 溶媒沈澱、溶媒抽出、硫安またはエタノール沈澱等を適宜組合せることにより所望のポリペプチドを精製する。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲルfiltration、疎水性、
ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である(*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。
15

また、天然由来のポリペプチドを精製して取得してもよい。例えば、後述の本発明のポリペプチドに対する抗体、を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる(*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。また、GSTとの融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。本発明のポリペプチドを融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa等を使用して不要な部分を切断することもできる。さらに、必要に応じキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシリ

エンドペプチダーゼ等の酵素を用い得られたポリペプチドを修飾することも可能である。

本発明のポリペプチド断片は、上述の合成及び遺伝子工学的な手法に加えて、
ペプチダーゼのような適当な酵素を用いて本発明のポリペプチドを切断して製造
5 することもできる。

<抗体>

本発明により、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片に対する抗体が
提供される。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメ
10 ラ抗体、一本鎖抗体(scFV) (Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol. 113, Rosenberg
and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp. 269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗
体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985)
Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 5
15 37-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; V
an Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(a
b')₂、Fc、Fv 等の抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は必要に応じ、P
EG 等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、β-ガラクトシダ
20 ゼ、マルトース結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質とし
て製造され得、二次抗体を用いずに検出できるようにしててもよい。また、ビオチ
ン等により抗体を標識することによりアビシン、 streptotavidin 等を用いて
抗体の回収を行い得るよう改変されていてもよい。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発
現する細胞を感作抗原として製造することができる。また、本発明のポリペプチ
25 ド若しくはその断片のうち短いものは、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペ
ットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合して免疫原として用いて

もよい。また、本発明のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバント、完全(または不完全)フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強化するために用いてよい。

ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のポリペプチドまたはその断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得る。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原を Phosphate-Buffered Saline (PBS) または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を 4~21 日毎に数回投与する。抗体の產生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてよい。具体的な方法として、例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

モノクローナル抗体を產生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞とポリエチレングリコール(PEG)等を用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milstein の方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46)に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞が挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノブテリン及びチミジンを含む培養液(HAT 培養液)で培養して選択する。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポ

リペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を产生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照するこ
5ともできる。

ハイブリドーマは、その他、最初にEBウイルスに感染させたヒトリンパ球を *in vitro*で免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U2 66等)と融合し、ヒト抗体を产生するハイブリドーマを得る方法(特開昭63-17688号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有
10するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体产生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(W092/03918; W093-02227; W094/02602; W094/25585; W0 96/33735; W096/34096; Mendez et al. (1997) *Nat. Genet.* 15: 146-56等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を产生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

15 また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, MacMillan Publishers LT D., UK 参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体产生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を产生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。
20 代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-9; Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-6; Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991))。

本発明の抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al., (1994) *J. Immunol.* 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) *Methods Enzymol.* 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) *Methods Enzymol.* 178: 497-515; Lamoyi (1986) *Methods Enzymol.* 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) *Trends Biotechnol.* 9: 132-7 参照)。

本発明の多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) *Behring Inst. Mill.* 78: 118-32)、(2)異なるモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを融合する方法(Millstein and Cuello (1983) *Nature* 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髄腫細胞等の真核細胞発現系をトランسفエクションした後、二特異性の一価部分を単離する方法(Zimmermann (1986) *Rev. Physio. Biochem. Pharmacol.* 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) *Int. J. Cancer* 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる(Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-8; EP404097; WO93/11161 参照)。

抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテインA及びGを用いて行う他、<ポリペプチドの製造>の項で詳細に記載した蛋白質精製技術によっても行い得る(*Antibodies: A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテインAを利用する場合、Hyper D、POROS、Sephadex F.F. (Pharmacia)等のプロテインAカラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等により決定することができる。

抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA等により測定することができる。ELISA法による測定の場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いで本発明のポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次抗体がアルカリフェオスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore(Pharmacia)等の市販の系を使用することもできる。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド及びその断片の精製に使用することができる。また、パーキンソン病等に対する細胞移植治療に好適に使用され得るドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得るために利用することもできる。

15

<ドーパミン産生ニューロンの選択方法>

本発明により分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択的に均一な集団として得る方法が提供された。より詳細には、本発明の 65B13 ポリペプチドに対する抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むことが予測される細胞試料とを接触させ、抗体に結合する細胞を選択することで本発明のポリペプチドを発現している細胞、即ち、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を獲得できる(図 12 から 14 参照)。細胞との接触前に、抗体を適當な担体に固定化して用いることも可能である。または、細胞と抗体とを接触させ、結合させた後、抗体のアフィニティーによる精製を行うことで、該抗体と結合した細胞を選択的に回収することもできる。例えば、本発明の抗体がピオチンと結合されている場合には、アビジンやストレプトアビジンを結合したプレートやカラムに

対して添加することにより精製を行うことができる。

また、65B13 は Ig ドメインを持つ接着分子様の構造を有し(図 6 参照)、培養細胞中で発現させた場合、65B13 を発現させた細胞同士が接着することが判っている。65B13 を発現させていない細胞とは接着しないため、65B13 を介した接着はホモフィリックな結合であると考えられる。このような 65B13 ポリペプチドの性質から、65B13 ポリペプチドの特に細胞外領域部分を利用し、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することもできる。例えば、適当な担体上に、65B13 ポリペプチドの細胞外領域部分を固定し、細胞と接触させることによりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を取得することが可能である。従って、本発明により、本発明のポリペプチドの少なくとも細胞外領域部分を含むペプチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロンを選択する方法が提供される。

本発明における分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離は、抗 65B13 抗体を用いたフローサイトメトリーにより効率的に行なうことができる(実施例 4、図 14)。

その他、65B13 に対するプロモーターを利用してドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することもできる(例えば、特開 2002-51775 号公報参照)。例えば、後述する 65B13 の発現領域解析により得られたプロモーター部分に対し、GFP 等の検出可能なマーカーをコードする遺伝子を連結した構築物を含むベクターを細胞に対してトランスフェクションすることができる。その他、65B13 遺伝子座へマーカーをコードする遺伝子をノックインすることができる。どちらの場合にも、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的にマーカー遺伝子の発現が検出されることとなり、特異的な細胞の選択が可能となる。

ここで使用する細胞試料は好ましくは、中脳腹側領域の細胞、または *in vitro* で分化誘導されたドーパミン産生ニューロンを含む培養培地である。*in vitro* におけるドーパミン産生ニューロンの分化誘導は、公知の ES 細胞、骨髓間質細胞、

神経由来の不死化セルライン(特表平 8-509215 号公報；特表平 11-506930 号公報；特表 2002-522070 号公報)、ニューロン始原細胞(特表平 11-509729 号公報)等の細胞を出発材料として、公知の方法により行うことができる。通常、ドーパミン産生ニューロンは、脳のドーパミン産生ニューロン領域から得た組織を神経組織由来の支持細胞層と共に培養することにより分化させることができる。さらに、
5 線条体及び皮質等の通常非ドーパミン産生神経組織からドーパミン産生細胞を誘導する方法も知られている(特表平 10-509319 号公報)。また、低酸素条件下での培養により、より多くドーパミン産生ニューロンを含む細胞が得られるとの報告も成されている(特表 2002-530068 号公報)。本発明のドーパミン産生ニューロン
10 前駆細胞の選択に用いる細胞試料は、如何なる方法により分離または培養された細胞群であってもよい。

また、本発明の抗体またはポリペプチドを固定する担体としては、細胞に対して無害なものである必要がある。例えば、合成または天然の有機高分子化合物、ガラスピーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭等の無機材料、及びこれらの表面
15 に多糖類、合成高分子等をコーティングしたものが考えられる。担体の形状には特に制限はなく、膜状、纖維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状等が挙げられ、その厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、大きさを種々変えることにより接触面積を制御することができる。

20 <ドーパミン産生ニューロン前駆細胞>

このようにして獲得された細胞は、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞であることから、従来の雑多な細胞集団または外来遺伝子を導入したドーパミン産生ニューロンと比べて、安全性、生存率、ネットワーク形成能の面で
25 PD 等の神経変性疾患の移植治療に好ましいものである。さらに、本方法により得られた本発明の細胞(群)は、分裂直後の前駆細胞であることから、*in vitro*において培地等の条件を選択することにより適当な段階まで分化させることも可能で

あり、種々の神経移植治療の材料としても好ましいものである。本発明の方法により得られたニューロン前駆細胞の移植では、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 個、さらに好ましくは $5 \sim 6 \times 10^4$ 個のニューロンを移植する。第1の方法としては、細胞の懸濁液を脳に移植する定位脳固定術(stereotaxic surgery)が挙げられる。また、ミクロ手術(microsurgery)により細胞を移植しても良い。ニューロン組織の移植方法については、Backlund 等(Backlund et al. (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73)、Lindvall 等(Lindvall et al. (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68)、Madrazo 等(Madrazo et al. (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4)の方法を参照することができる。

さらに、本発明の細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、PD治療のターゲット探索、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、並びに成熟を指標としたスクリーニング等にも利用することができる。

15 <遺伝子発現レベルの比較>

本発明の抗体を用いて得られた分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、該細胞において特異的に発現している遺伝子を単離する材料として使用することができる。さらに、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的に発現している遺伝子を調べ、単離することもできる。また、分化／誘導／増殖させた細胞と元の前駆細胞とにおいて発現レベルに差違のある遺伝子を調べることによりドーパミン産生ニューロンの生体内における分化に必要とされる遺伝子を調べることもできる。このような遺伝子はドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病的治療対象候補となり得るので、当該遺伝子を決定し、単離することは非常に有用である。

本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞と該細胞から分化／誘導／増殖さ

れた細胞若しくはその他の細胞、または該分化／誘導／増殖された細胞とその他の細胞との間での遺伝子の発現レベルの比較は、慣用の細胞 *in situ*ハイブリダイゼーション、ノーザンプロットハイブリダイゼーション、RNA ドットプロットハイブリダイゼーション、逆転写 PCR、RNase 保護アッセイ、DNA マイクロアレイハイブリダイゼーション、遺伝子発現の連続解析(SAGE; serial analysis of gene expression) (Velculescu et al. (1995) *Science* 270: 484-7)、差し引きハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)、代表差違分析(representation difference analysis; RDA) (Lisitsyn (1995) *Trends Genet.* 11: 303-7) 等により行うことができる。

10 細胞 *in situ*ハイブリダイゼーションでは、特定の RNA 配列に特異的な標識プローブを用い細胞から調製した総 RNA または polyA⁺RNA に対してハイブリダイゼーションを行うことにより、個々の細胞における RNA のプロセッシング、輸送、細胞質への局在化が起こる場所等を調べることができる。また、RNA の大きさをゲル電気泳動等によりサイズ分画して決定することもできる。また、定量的な蛍光 *in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)及びデジタル画像顕微鏡を用いれば、RNA 転写産物を *in situ*で視覚的に捉えることも可能であり (Femino et al. (1998) *Science* 280: 585-90)、本発明において利用することができる。

遺伝子発現の解析で逆転写 PCR を用いた場合、特定遺伝子の発現を大まかに定量することができる。本方法では、1 つの RNA 転写産物の種々のアイソフォームを検出及び解析することも可能である。逆転写 PCR においてはまず、エキソン特異性プライマーを用いた逆転写 PCR を行い、予想された産物以外の増幅産物が検出された場合、それらを解析することにより選択的スプライシングにより生じる mRNA アイソフォームを同定することができる。例えば、Pykett et al. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3: 559-64 等に記載の方法を参照することができる。特に大まかな発現パターンを迅速に解析することが求められる場合、本発明の PCR を利用した本方法は、その速さ、感度の高さ、簡便さの点からも望ましいものであ

る。

DNA チップを使用することにより、遺伝子発現スクリーニングの能率を向上させることができる。ここで、DNA チップとは、ガラス等の担体表面上にオリゴヌクレオチドまたは DNA クローン等を高密度に固定した小型のアレイである。例え 5 ば、多重発現スクリーニングを行うためには、各目的遺伝子に対する cDNA クローンまたは該遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドをチップに対して固定化し、マイクロアレイを作製する。次に本発明のドーパミン特異的ニューロン前駆細胞、または該細胞より分化／誘導／増殖された細胞より RNA を調製し、逆転写酵素処理を行い、cDNA を得る。次に、得られた cDNA 試料を蛍光タグ等のタグにより標識 10 し、マイクロアレイに対するハイブリダイゼーションを行う。その結果、総標識 cDNA 中、細胞内で活発に発現している遺伝子の割合が高くなり、あまり発現されていない遺伝子の割合は低くなる。即ち、標識 cDNA とチップ上の cDNA クローンまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を意味する蛍光シグナルの強度は、標識 cDNA 内での各配列の発現の度合いを示すことなり、遺伝子発現の定量を 15 可能成らしめる。

また、縮重 PCR プライマーを用いた逆転写 PCR を行う mRNA ディファレンシャルディスプレイにより、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞について多数の遺伝子の発現を同時に解析することもできる。まず、特定の mRNA の polyA 尾部に 3' 末端の 1 または 2 つの塩 20 基を変更した修飾オリゴ dT プライマーを準備し、本発明の前駆細胞または該細胞から分化／増殖された細胞、及び、発現を比較する対照細胞から単離した総 RNA に対して逆転写酵素反応を行う (Liang et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 3 269-75)。変更した塩基が「G」であれば、polyA 尾部の直前に C を持つ mRNA を選択的に増幅することができ、また「CA」であれば、TG を直前に持つ mRNA を増幅 25 することができる。次に、第 2 のプライマーとして、10 塩基程度の長さの任意の配列を有するものを用意し、修飾オリゴ dT プライマー及び第 2 のプライマーを使

用して PCR 増幅反応を行う。増幅産物を泳動距離の長いポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、サイズ分画する。このような方法により、本発明の細胞と対照細胞とで各細胞に特異的に発現している mRNA 由来の cDNA は、一方の試料を泳動した場合にのみ検出されるバンドとして検出することができる。この方法で 5 は、同定されていない遺伝子の発現についても解析することができる。

SAGE 分析は、多数の転写産物の発現を同時に検出することができ、また検出に特殊な装置を必要としない点で好ましい分析方法の一つである。まず、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞より polyA⁺RNA を慣用の方法により抽出する。次に、ピオチン化オリゴ dT プラ 10 イマーを用い、前記 RNA を cDNA に変換し、4 塩基認識制限酵素(アンカー用酵素；AE)で処理する。ここで、AE 処理断片は、その 3' 末端にピオチン基を含んだ形となる。次に、AE 処理断片をストレプトアビシンに結合させ、結合された cDNA を 2 画分に分け、それぞれの画分を別々の 2 本鎖オリゴスクレオチドアダプター(リン 15 カー)A 及び B に連結する。このリンカーは、(1)アンカー用酵素の作用で生じる 突出部の配列と相補的な配列を有する 1 本鎖突出部、(2)タグ用酵素(tagging enz yme; TE)となる IIS 型制限酵素(認識部位より 20bp 以下の離れた定位置の切断を行う)の 5' 塩基認識配列、及び(3)PCR 用特異的プライマーを構成するのに十分な追 加配列より構成される。ここで、リンカーを連結した cDNA をタグ用酵素で切断す 20 ることにより、リンカー結合型の状態で cDNA 配列部分のみが短鎖配列タグとなる。 次に、リンカーの異なる 2 種類のプールを互いに連結し、リンカーA 及び B に特 25 異的プライマーを使用して PCR 増幅する。その結果、増幅産物はリンカーA 及び B に結合した 2 つの隣接配列タグ(ダイタグ; ditag)を含む多様な配列の混在物として得られる。そこで、増幅産物をアンカー用酵素により処理し、遊離したダイタグ部分を通常の連結反応により鎖状に連結し、クローニングを行う。クローニング グにより得られたクローンの塩基配列を決定することにより、一定長の連續ダイタグの読み出しを得ることができる。このようにしてクローンの塩基配列を決定

し、配列タグの情報が得られれば、それぞれのタグに該当する mRNA の存在を同定することができる。

差し引きハイブリダイゼーションは、種々の組織または細胞間で発現の差違のある遺伝子のクローニングによく用いられる方法であるが、本発明のドーパミン 5 產生ニューロン前駆細胞、またはそれから分化／誘導／増殖された細胞において特異的に発現している遺伝子をクローニングするのにも使用することができる。

まず、本発明の前記細胞のうちの試験する細胞の DNA 試料を調製する(以下、テスト DNA と呼ぶ)。次に、比較する細胞の DNA(以下、ドライバーDNA と呼ぶ)を調製する。テスト DNA とドライバーDNA とを逆に用いることもできる。いずれにせよ、 10 テスト DNA に存在し、ドライバーDNA に存在しない遺伝子の存在が検出される。

次に、調製したテスト DNA 及び大過剰量のドライバーDNA を混合し、変性させ一本鎖 DNA とした後にアニーリングさせる。アニーリング条件を調節することにより、ドライバーDNA 中には存在しない特異的な配列をテスト DNA 由来の DNA のみからなる二本鎖 DNA として単離することができる。より詳細な方法については、S 15 waroop et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1954 及び Yasunaga et al. (1999) Nature Genet. 21: 363-9 等を参照することもできる。

RDA 法は、PCR を利用した、ドライバーDNA に存在しないテスト DNA 中の配列を選択的に增幅することを可能とする方法であり、上述のその他の方法と同様に本発明において用いることができる。より詳細な手順については、Lisitsyn (1995) 20 Trends Genet. 11: 303-7 及び Schutte et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5950-4 を参照することができる。

以上のようにして検出、単離されたドーパミン產生ニューロン前駆細胞、または該細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的な遺伝子を上述の各種公知の方法によりベクター等に挿入し、配列決定、発現解析を行うこともできる。

本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む、スクリーニング方法が提供される。本方法によりスクリーニングされる化合物は、ドーパミン産生ニューロンの分化、増殖等を調節する機能を示すことから、ドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得、有用と考えられる。

ここで、「被験物質」とはどのような化合物であってもよいが、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーが挙げられる。

細胞の分化や増殖は、被験物質と接触させない場合における細胞の状態と比較することにより検出することができる。細胞の分化や増殖は、顕微鏡下において形態学的な観察を行うこと、または、細胞で産生されるドーパミン等の物質を検出、定量して検出してもよい。

<65B13 の発現領域解析>

本発明により 65B13 遺伝子の発現制御領域が提供される。本発明の発現制御領域は、本発明のポリヌクレオチドを利用してゲノム DNA から公知の方法によってクローニングすることができる。例えば、S1 マッピング法のような転写開始点の特定方法(細胞工学 別冊 8 新細胞工学実験プロトコール、東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社 (1993) pp. 362-374)が公知であり、本発明において利用できる。一般に、遺伝子の発現制御領域は、遺伝子の 5' 末端の 15~100bp、好ましくは 30~50bp をプローブ DNA として利用して、ゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる(本発明においては、配列

番号:1 の 1~176 番目または配列番号:2 の 1~126 番目の塩基全部またはその 1 部)。このようにして得られるクローンは、10 kbp 以上の 5' 非翻訳領域を含むものであるので、次にエキソヌクレアーゼ等により処理し短縮化または断片化する。最後に、短縮された発現制御領域の候補を含む配列部分をレポーター遺伝子を利 5 用して、その発現の有無、強さ、制御等について評価し、本発明の 65B13 の発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を決定することができる。

遺伝子の発現制御領域は、Neural Network 等のプログラム (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996)) を用いて予測することができる。さらに、発現制御領域の活性最小単位を予測するプログラム (<http://biosci.cbs.umn.edu/software/proscan/promoterscan.htm>; Prestridge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-32) も公知であり、本発明において用いることができる。

このようにして単離された、65B13 遺伝子の発現領域は、*in vivo* で分裂停止直 15 後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的に所望の蛋白質を産生するのに利 用することができる。

<リガンドの同定>

本発明により、本発明のポリペプチドに対するリガンドが提供された。本発明 20 のポリペプチドは膜貫通ドメインを有することから、天然において細胞膜中に埋め込まれた状態で存在すると考えられる。分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞で一過性に発現されていることから、ニューロンの成熟に関与していることが考えられる。従って、本発明のポリペプチドに対するアゴニストやアンタゴニスト等の機能を示す可能性があるリガンドは、ドーパミン産生ニューロンの *in vivo*、*ex vivo* 及び *in vitro* における分化を制御するのに利用できる可 25 能性がある。本発明のポリペプチドに対するリガンドの同定においては、まず、

本発明のポリペプチドと候補化合物とを接触させ、結合の有無を検定する。この際、本発明のポリペプチドを担体に固定したり、細胞膜に埋めこまれた状態に発現させて用いることもできる。候補化合物としては特に制限はなく、遺伝子ライ 5 ブラリーの発現産物、海洋生物由来の天然成分、各種細胞の抽出物、公知化合物 及びペプチド、植物由来の天然成分、生体組織抽出物、微生物の培養上清、並び 10 にファージディスプレイ法等によりランダムに製造されたペプチド群 (J. Mol. Bi ol. 222: 301-10 (1991)) 等が含まれる。また、結合の検出を容易にするために、 候補化合物は標識しても良い。

10 図面の簡単な説明

図 1 は、65B13-a の cDNA 配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列 及び膜貫通領域が下線で示される。

図 2 は、65B13-a の cDNA 配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列 及び膜貫通領域が下線で示される。図 1 の続きを示している。

15 図 3 は、65B13-b の cDNA 配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列 及び膜貫通領域が下線で示される。

図 4 は、65B13-b の cDNA 配列及びアミノ酸配列を示す図である。シグナル配列 及び膜貫通領域が下線で示される。図 3 の続きを示している。

図 5 は、65B13-a 及び 65B13-b のアミノ酸配列の比較した図である。

20 図 6 は、65B13 の構造の模式図である。黒く塗りつぶされた部分は膜貫通領域 を、また Ig は、Ig ドメインを示す。

図 7 は、E12.5 マウス脳における 65B13mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼ ーションにより解析した結果を示す写真である。A:矢状断面、B:傍矢状断面。HB: 後脳、MB:中脳、SC:脊髄、CB:小脳原基。

25 図 8 は、E12.5 マウス脊髄における 65B13mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼ ーションにより解析した結果を示す写真である。A:65B13、B:NCAM、C:65B13、K

- 44 -

i 67、及び NCAM の発現領域の比較(各々、A 及び B の枠内部分を拡大して示す)。

図 9 は、E12.5 マウス中脳腹側における 65B13mRNA、及びチロシンヒドロキシラーゼ(TH)mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した結果を示す写真である。A:65B13、B:TH。

5 図 10 は、65B13 の中脳における発現パターンを示す模式図である。

図 11 は、65B13 の発現時期を示す模式図である。

図 12 は、抗 65B13 抗体を用いたドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離及び活用法を示す模式図である。

10 図 13 は、65B13 (Cy3)、Nurr1 (FITC)、TH (Cy5) タンパク質の発現を、それぞれに対する抗体を用いて免疫蛍光染色法にて解析した結果を示す写真である。

図 14 は、65B13 モノクローナル抗体を用いて、マウス 12.5 日脳中脳腹側 (A)、または *in vitro* で ES 細胞からドーパミン産生ニューロンを分化誘導した細胞群 (B) を染色し、フローサイトメトリーを用いて 65B13 発現細胞を検出した結果を示す図である。

15

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明についてより詳細に検討するが、本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。

20

[実施例 1] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子の単離及び配列解析

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5 マウス中脳腹側と背側の RNA を用いてサブトラクション (N-RDA) 法により発現の差のある遺伝子を增幅し、得られた遺伝子の配列を解析した。

25

1. N-RDA 法

- 45 -

1-1. アダプターの調製

下記のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、100 μ M に調製した。

(ad2: ad2S+ad2A、ad3: ad3S+ad3A、ad4: ad4S+ad4A、ad5: ad5S+ad5A、ad13: ad13S+ad13A)

5 ad2S: cagctccacaaccta catcatccgt (配列番号:11)

ad2A: acggaatgtatgt (配列番号:12)

ad3S: gtccatcttc tctcttgagactctgg (配列番号:13)

ad3A: accagagtctca (配列番号:14)

ad4S: ctgatgggtgtcttctgtgagtg (配列番号:15)

10 ad4A: acacactcacag (配列番号:16)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgtgacagt (配列番号:17)

ad5A: actgtcacactg (配列番号:18)

ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgatcg (配列番号:19)

ad13A: acgatcgacagt (配列番号:20)

15

1-2. cDNA 合成

マウス 12.5 日胚(日本 SLC)中脳腹側及び背側領域より RNeasy mini kit (Qiagel)を用い全 RNA を調製し、cDNA synthesis kit (TAKARA)を用いて二本鎖 cDNA を合成した。制限酵素 RsaI で消化したのち、ad2 を付加し、ad2S をプライマーとして 72°Cで 5 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 2 分の反応を 15 サイクルの PCR を行い、最後に 72°Cで 2 分インキュベートし、cDNA を増幅した。N-RDA の PCR はすべて以下の反応液組成で行った。

10 \times ExTaq 5 μ l

2.5 mM dNTP 4 μ l

25 ExTaq 0.25 μ l

100 μ M primer 0.5 μ l

- 46 -

cDNA 2 μ l

蒸留水 38.25 μ l

1-3. Driver の作製

5 ad2S で増幅した cDNA をさらに、94°Cで 2 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 2 分の反応を 5 サイクルの PCR を行い、最後に 7 2°Cで 2 分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて cDNA を精製し、RsaI 消化した。1 回のサブトラクションに 3 μ g ずつ使用した。

10 1-4. Tester の作製

ad2S で増幅した cDNA をさらに 94°Cで 2 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 2 分の反応を 5 サイクルの PCR を行い、最後に 72°Cで 2 分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて cDNA を精製し、RsaI 消化した。60ng の RsaI 消化 cDNA に ad3 を付加した。

15

1-5. サブトラクション 1 回目

上記 3 及び 4 で作製した Tester および Driver を混合し、エタノール沈殿した後に、1xPCR buffer 1 μ l に溶解した。98°C 5 分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 1 μ l を加えた。さらに 98°C 5 分の後、68°Cで 16 時間ハイブリダイズさせた。

20 ハイブリダイズさせた cDNA を ad3S をプライマーとして 72°Cで 5 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 2 分の反応を 10 サイクル行った。続いて、Mung Bean Nuclease (TAKARA) で消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。さらに 94°Cで 2 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 2 分の反応を 13 サイクルの PCR を行い、最後に 72°Cで 2 分インキュベートした。

1-6. 均一化

サブトラクション 1 回目で増幅した cDNA 8ng に 2xPCR buffer 1 μ l を加えた。98°C 5 分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 2 μ l を加えた。さらに 98°C 5 分の後、68°C で 16 時間ハイブリダイズさせた。

5 ハイブリダイズさせた cDNA を RsaI で消化し、Qiaquick PCR purification kit で精製した。これを ad3S をプライマーとして 94°C で 2 分インキュベートした後、94°C で 30 秒、65°C で 30 秒、及び 72°C で 2 分の反応を 11 サイクルの PCR を行い、最後に 72°C で 2 分インキュベートした。RsaI で消化し、ad4 を付加した。

10 1-7. サブトラクション 2 回目

上記 6 で ad4 を付加した cDNA 20ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、さらに、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的に RsaI 消化した cDNA に ad5 を付加した。

15 1-8. サブトラクション 3 回目

上記 7 で ad5 を付加した cDNA 2ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、さらに、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的に RsaI 消化した cDNA に ad13 を付加した。

20 1-9. サブトラクション 4 回目

上記 8 で ad13 を付加した cDNA 2ng を Tester として、上記 3 の Driver と混合し、以下、上記 5 と同様の方法でサブトラクションを行った。増幅した cDNA を pCRII (Invitrogen) にクローニングし、ABI3100 シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。

25 次に、N-RDA 法により得られた 65B13 断片の配列を用い、以下の方法で RACE を行った。

2. RACE 法

マウス 12.5 日胚脳より RNeasy mini kit (Qiagen) により全 RNA を調製し、 μ M ACS mRNA isolation kit (Miltenyi Biotec) を用いて mRNA を調製した。調製した mRNA より、Superscript choice system (Invitrogen) および pCRII ベクター (Invitrogen) を用いて cDNA ライブラリーを調製した。これよりプラスミド DNA を調製し、以下のプライマーを用いて PCR を行った。

TAU2: GGCTTTACACTTATGCTTCCGGCTC (配列番号:21)

TAU4: CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGC (配列番号:22)

10 TAD3: AGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGG (配列番号:23)

TAD4: CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG (配列番号:24)

65B13 F1: CTTCCGTATGCTACCTGTCTCCAC (配列番号:25)

65B13 F2: TCCATCTCTCCAAGTGAAGGGTCTTG (配列番号:26)

65B13 R1: CCAACAGTCCTGCATGCTTGTAAATGA (配列番号:27)

15 65B13 R2: TCCTTCAATGTTCAGTTTGGAGGGG (配列番号:28)

PCR の条件は次の通りであった。

1st PCR

10×ExTaq 2 μ l

2.5 mM dNTP 1.6 μ l

20 ExTaq 0.1 μ l

100 μ M TAU2 または TAD3 0.04 μ l

100 μ M 65B13 F1 または R1 0.2 μ l

cDNA (10ng/ μ l) 1 μ l

蒸留水 15.06 μ l

25 94°Cで5分インキュベートした後、94°Cで30秒、65°Cで30秒、及び72°Cで5分の反応を25サイクル行い、最後に72°Cで2分インキュベートした。続いて、1

- 49 -

回目の PCR により得られた産物を 100 倍希釈して 2nd PCR を行った。2nd PCR の条件は次の通りであった。

2nd PCR

10×ExTaq 5 μ l

5 2.5 mM dNTP 4 μ l

ExTaq 0.25 μ l

100 μ M TAU4 または TAD4 0.1 μ l

100 μ M 65B13 F2 または R2 0.5 μ l

1/100 1st PCR 産物 1 μ l

10 蒸留水 15.06 μ l

94°Cで 5 分インキュベートした後、94°Cで 30 秒、65°Cで 30 秒、及び 72°Cで 5 分の反応を 25 サイクル行い、最後に 72°Cで 2 分インキュベートした。増幅された cDNA 断片を pCRII にクローニングし、ABI3100 シーケンスアナライザーを用いてシーケンスの解析を行った。

15 得られた 2 つの遺伝子、65B13-a 及び 65B13-b のヌクレオチド配列を配列番号: 1(図 1 及び 2)、及び配列番号: 2(図 3 及び 4) として示す。65B13-a のコード領域は、配列番号: 1 の 177 番目の A から始まり、2278~2280 番目の終止コドンまで続き、700 アミノ酸からなる蛋白質をコードする。そして、そのうち 177 番目から 228 番目までの配列にコードされる 17 アミノ酸残基はシグナル配列、1717 番目から 1767 番目までの配列にコードされる 17 アミノ酸残基は膜貫通領域であった。それに対し、65B13-b のコード領域は、配列番号: 2 の 127 番目の A から始まり、2277~2079 番目の終止コドンまで続き、650 アミノ酸からなる蛋白質をコードする。そして、そのうち 127 番目から 177 番目までの配列にコードされる 17 アミノ酸残基はシグナル配列、1516 番目から 1566 番目までの配列にコードされる 17 アミノ酸残基は膜貫通領域であった。65B13-a 及び 65B13-b 遺伝子にコードされるアミノ酸配列を配列番号: 3 及び 4 として示す。図 5 において示すように、両遺

伝子によりコードされるアミノ酸配列を比較したところ、65B13-a と 65B13-b とはアルタナティブスプライシングによるアイソフォームであり、65B13-b は 65B13-a に対し N 末端側の 50 アミノ酸が欠失することが判明した。65B13 遺伝子によりコードされる蛋白質はホモロジーサーチにより、図 6 に示すような 5 つの Ig ドメインを持つ、一回膜貫通型蛋白質であると考えられた。

[実施例 2] 65B13 遺伝子の発現解析

次に、これらの遺伝子を用いて以下のプロトコールにより *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。

まず、マウス 12.5 日胚を OCT で包埋し、厚さ 16 μ m の新鮮凍結切片を作製した。スライドガラス上で乾燥させた後に 4%PFA で室温 30 分間固定した。PBS で洗浄した後、ハイブリダイゼーション (1 μ g/ml DIG 化 RNA プローブ、50% ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS, 50 μ g/ml yeast RNA, 50 μ g/ml Heparin) を 65 度で 40 時間行った。その後、洗浄 (50% ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS) を 65 度で行い、RNase 处理 (5 μ g/ml RNase) を室温 5 分間行った。0.2xSSC で 65 度の洗浄、1xTBST で室温で洗浄の後、プロッキング (Blocking reagent: Roche) を行った。アルカリ フォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 (DAKO) を反応させ、洗浄 (1xTBST, 2mM Levamisole) の後、NBT/BCIP (DAKO) を基質として発色させた。

そして、これらの遺伝子を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期である E12.5 で、65B13 が中脳腹側、小脳原基、後脳、及び脊髄で発現していることが判った (図 7)。脊髄における発現をさらに増殖マーカーである Ki67 及び成熟マーカーである NCAM と比較したところ、Ki67 陽性の神経前駆細胞 (neural progenitor) の増殖する領域である脳室領域 (ventricular zone; VZ) 内の一部の細胞に 65B13 が発現しているのに対し、分裂停止後より成熟した NCAM 陽性の前駆細胞の存在する外套層 (mantle layer; ML) 内には発現が認められなかった (図 8)。脊髄以外の領域でも同様

に、VZ 内の一部の細胞で発現が認められた。これらの発現パターンから、65B13 は分裂停止直後の神経前駆細胞で一過性に発現するものと考えられた。

中脳では、最も腹側にあたる領域の VZ 内のみで発現が認められた。ドーパミン 5. 產生ニューロンのマーカー遺伝子であるチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase; TH)の発現と比較すると、TH は ML にのみ発現しているため同一の細胞 10 で両者の発現が認められることはものの、背-腹軸方向で発現領域が完全に一致していることが判明した(図 9)。一般に神経管内の神経細胞は、まず VZ 内で増殖し、分化開始と共に分裂を停止し、その後、すぐ外側の ML に移動してから成熟 15 することが知られている。従って、ドーパミン产生ニューロンの前駆体は、TH 発現領域のすぐ内側の VZ 内で増殖し、分裂停止後に外側に移動してから TH を発現 するものと考えられている。この前駆体の増殖する VZ 領域が 65B13 の発現領域と 一致することから、65B13 は、中脳では分裂停止直後のドーパミン产生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現すると考えられた(図 10 及び 11)。

15 [実施例 3] 65B13タンパク質の発現解析

次に、65B13遺伝子のうち、細胞外領域をコードする遺伝子配列を用いて、以下のプロトコールにより抗65B13抗体を作製し、免疫組織染色による発現解析を行った。

まず、65B13遺伝子のうち、細胞外領域をコードする遺伝子配列を293E細胞に遺 20 伝子導入して、65B13タンパク質の細胞外領域を発現させて回収した。回収したタ ンパク質をハムスターに免疫したのち、リンパ球細胞を取り出してミエローマ細 25 胞とフュージョンさせた。フュージョンさせた細胞をマウスの腹腔内に移植し、 腹水を得て、抗65B13モノクローナル抗体を精製した。次にマウス12.5日胚を4%PFA/PBS(-)で4℃、2時間固定したのち、20%ショ糖/PBS(-)で4℃、一晩置換し、OCT で包埋した。厚さ12μmの切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた後、室温で30分乾燥させ、PBS(-)で再び温潤させた。その後、プロッキング(ブロックエー

ス) を室温、20分間行い、作製した抗65B13モノクローナル抗体 (10ug/ml、2.5% ブロックエース/PBS) 、抗TH抗体 (Chemicon、0.7ug/ml、2.5%ブロックエース/PBS) 、抗Nurr1抗体 (Santa Cruz、4ug/ml、2.5%ブロックエース/PBS) を室温、1時間反応させた後、さらに4°C、一晩反応させた。0.1%Triton X-100/PBS (-) で、室温、10分間の洗浄を4回行った。Cy3標識抗ハムスターIgG抗体、FITC標識抗ウサギ IgG抗体、Cy5標識抗マウスIgG抗体 (Jackson、10ug/ml、2.5%ブロックエース) を室温、1時間反応させ、同様に洗浄を行った後、PBS (-) によって室温、10分間洗浄し、包埋した。

そして、作製した抗65B13モノクローナル抗体を用いた免疫組織染色による発現解析の結果、*in situ*ハイブリダイゼーションによる発現解析の結果と同様に、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期であるE12.5で、中脳腹側に発現が認められた (図13)。ドーパミン産生ニューロンのマーカーであるTH、Nurr1タンパク質の発現と比較すると、65B13タンパク質はTH、Nurr1タンパク質が発現する中脳最腹側のVZ側に発現していることから、65B13タンパク質はドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現していると考えられた。

[実施例4]フローサイトメトリーによる65B13発現細胞の検出

次に、抗65B13モノクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーによる65B13発現細胞の検出を行った。

まず、マウス12.5日胚より中脳腹側部分を切り出したもの、または、*in vitro*においてES細胞より分化誘導させたドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む細胞群を、細胞分散バッファー (Invitrogen) を用いて分散させた後、固定・透過処理せずに、抗65B13モノクローナル抗体 (10ug/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/PBS) で4°C、20分間染色した。その後、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/PBS (-) で4°C、3分間の洗浄を3回行い、PE標識抗ハムスターIgG抗体 (Pharmingen、4ug/ml、1%ウシ胎児血清、1mM EDTA/PBS) で4°C、20分間染色し、同様に洗浄して、フローサイ

トメーターにて65B13発現細胞を検出した。

そして、作製した抗65B13モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーによる65B13発現細胞の検出の結果、65B13タンパク質を発現する集団を検出した（図14）。固定・透過処理することなく、65B13発現細胞を検出できることから、

5 セルソーターを付属したフローサイトメーターを用いることにより、65B13発現細胞を生細胞の状態で分離することが可能であると考えられた。65B13タンパク質はドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現していると考えられることから、65B13はドーパミン産生ニューロン前駆細胞の分離に有用であると考えられた。

10 産業上の利用の可能性

本発明により、分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する新規遺伝子65B13が得られた。細胞における該65B13の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となった。また、分裂停止直後のニューロン前駆細胞を選択的に得られるため、成熟した細胞の求められる治療等において使用する場合であっても、*in vitro*で最適な状態へと容易に分化させることができる。さらに、本発明の遺伝子を用いて得られるドーパミン産生ニューロン前駆細胞により、該細胞に特異的に発現している遺伝子を単離することが可能となった。該細胞は、パーキンソン病等の神経変性疾患に対する医薬を開発する上でも有用と考えられる。分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞という、ニューロン形成における初期の前駆細胞は、さらに、ニューロンの成熟過程、即ち、成熟過程に関与する種々の因子を明らかにするのに役立つ。このような因子の解明は、神経変性疾患の治療に大きく貢献することが予期される。さらに、該細胞の成熟を指標として、その過程を調節（阻害または促進）するような物質のスクリーニングに用いることもできる。

請求の範囲

1. 分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現する 65B1
3 ポリペプチド、またはその抗原性断片をコードする以下の(1)～(4)のヌク
5 レオチド配列から選択される配列を含むポリヌクレオチド。
 - (1) 配列番号:1 の 177 から 2280 番目の塩基、若しくは配列番号:2 の 127 番目
から 2079 番目の塩基を含む核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列
 - (2) 配列番号:3 若しくは 4 記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、また
は該核酸配列に相補的な配列
 - (3) 配列番号:3 若しくは 4 記載のアミノ酸配列においてシグナル配列部分を
欠く配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列
 - (4) 配列番号:3 または 4 記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のア
ミノ酸が欠失、挿入、置換、または付加されたアミノ酸配列をコードする
核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列
- 10 (5) 上記(1)の配列に対してストリンジエントな条件下でハイブリダイズする
核酸配列
2. 請求項 1 記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
3. 請求項 1 記載のポリヌクレオチドまたは請求項 2 記載のベクターを含む宿主
細胞。
- 20 4. 請求項 1 記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。
5. 請求項 4 記載のポリペプチドの断片であり、少なくとも 8 アミノ酸残基を有
するポリペプチド断片。
6. 請求項 4 記載のポリペプチド、または請求項 5 記載のポリペプチド断片に対
する抗体。
- 25 7. 請求項 5 記載のポリペプチド断片をコードするヌクレオチド鎖。
8. ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、請求項 6 記載の抗体とド

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

9. ドーパミン産生ニューロンを選択する方法であり、請求項 4 記載のポリペプチドの少なくとも細胞外領域部分を含むペプチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

10. 請求項 8 または 9 記載の方法により選択された分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞。

11. ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項 10 記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。

12. 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、請求項 10 記載の前駆細胞に對し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法。

1

GAT	GAG	CCA	GAT	TTC	GGG	GAC	TCT	GGG	CCA	GAC	ATA	AAA	TCT	TCC	AGC	CCG	GAG	54
AGA	ATT	GTG	TGC	AGA	GAG	GGG	CTC	CAG	TCC	AGC	GTG	GTG	TGA	GAG	GCG	TGC	TAT	108
CAA	GAA	AGA	AGT	TGG	AGG	GGG	ACC	AGT	GCA	ACC	CTA	ACT	CTA	CGA	GAT	CTT	GGG	162
GTA	CAC	ACA	CTC	GGG	ATG	CTG	GCC	TCC	GCC	CTC	CTC	GTT	TTC	CTT	TGC	TGT	TTC	216
	M	L	A	S	A	L	L	V	F	L	C	C	C	F				
AAA	GGA	CAT	GCA	GGC	TCA	TCG	CCC	CAT	TTC	CTA	CAA	CAG	CCA	GAG	GAC	ATG	GTG	270
K	G	H	A	G	S	S	P	H	F	L	Q	Q	P	E	D	M	V	
GTG	CTG	TTG	GGG	GAG	GAA	GCC	CGG	CTG	CCC	TGC	GCT	CTG	GGC	GCG	TAC	AGG	GGG	324
V	L	L	G	E	E	A	R	L	P	C	A	L	G	A	Y	R	G	
CTC	GTG	CAG	TGG	ACT	AAG	GAT	GGG	CTG	GCT	CTA	GGG	GGC	GAA	AGA	GAC	CTT	CCA	378
L	V	Q	W	T	K	D	G	L	A	L	G	G	E	R	D	L	P	
GGG	TGG	TCC	CGG	TAC	TGG	ATA	TCG	GGG	AAT	TCA	GCC	AGT	GGC	CAG	CAT	GAC	CTC	432
G	W	S	R	Y	W	I	S	G	N	S	A	S	G	Q	H	D	L	
CAC	ATT	AAG	CCT	GTG	GAA	TTG	GAA	GAT	GAG	GCA	TCG	TAT	GAG	TGC	CAG	GCT	TCG	486
H	I	K	P	V	E	L	E	D	E	A	S	Y	E	C	Q	A	S	
CAA	GCA	GGT	CTC	CGA	TCA	CGA	CCA	GCC	CAA	CTG	CAC	GTG	ATG	GTC	CCC	CCA	GAA	540
Q	A	G	L	R	S	R	P	A	Q	L	H	V	M	V	P	P	E	
GCT	CCC	CAG	GTA	CTA	GGC	GGC	CCC	TCT	GTG	TCT	CTG	GTG	GCT	GGA	GTT	CCT	GGA	594
A	P	Q	V	L	G	G	P	S	V	S	L	V	A	G	V	P	G	
AAT	CTG	ACC	TGT	CGG	AGT	CGT	GGG	GAT	TCC	CGA	CCT	GCC	CCT	GAA	CTA	CTG	TGG	648
N	L	T	C	R	S	R	G	D	S	R	P	A	P	E	L	L	W	
TTC	CGA	GAT	GGG	ATC	CGG	CTG	GAT	GCG	AGC	AGC	TTC	CAC	CAG	ACC	ACG	CTG	AAG	702
F	R	D	G	I	R	L	D	A	S	S	F	H	Q	T	T	L	K	
GAC	AAG	GCC	ACT	GGA	ACA	GTG	GAA	AAC	ACC	TTA	TTC	CTG	ACC	CCT	TCC	AGT	CAT	756
D	K	A	T	G	T	V	E	N	T	L	F	L	T	P	S	S	H	
GAT	GAT	GGC	GCC	ACC	TTG	ATC	TGC	AGA	GCG	CGA	AGC	CAG	GCC	CTG	CCC	ACA	GGG	810
D	D	G	A	T	L	I	C	R	A	R	S	Q	A	L	P	T	G	
AGG	GAC	ACA	GCT	GTT	ACA	CTG	AGC	CTT	CAG	TAT	CCC	CCA	ATG	GTG	ACT	CTG	TCT	864
R	D	T	A	V	T	L	S	L	Q	Y	P	P	M	V	T	L	S	
GCT	GAG	CCC	CAG	ACT	GTG	CAG	GAG	GGA	GAG	AAG	GTG	ACT	TTC	CTG	TGT	CAA	GCC	918
A	E	P	Q	T	V	Q	E	G	E	K	V	T	F	L	C	Q	A	
ACT	GCC	CAG	CCT	CCT	GTC	ACT	GGC	TAC	AGG	TGG	GCG	AAG	GGG	GGA	TCC	CCG	GTG	972
T	A	Q	P	P	V	T	G	Y	R	W	A	K	G	G	S	P	V	
CTC	GGG	GCA	CGT	GGG	CCA	AGG	TTG	GAG	GTC	GTC	GCA	GAT	GCC	ACT	TTC	CTG	ACT	1026
L	G	A	R	G	P	R	L	E	V	V	A	D	A	T	F	L	T	
GAG	CCG	GTG	TCC	TGC	GAG	GTC	AGC	AAC	GCG	GTC	GGA	AGC	GCC	AAC	CGC	AGC	ACG	1080
E	P	V	S	C	E	V	S	N	A	V	G	S	A	N	R	S	T	
GCG	CTG	GAA	GTG	TTG	TAT	GGA	CCC	ATT	CTG	CAG	GCA	AAA	CCT	AAG	TCC	GTG	TCC	1134
A	L	E	V	L	Y	G	P	I	L	Q	A	K	P	K	S	V	S	
GTG	GAC	GTG	GGG	AAA	GAT	GCC	TCC	TTC	AGC	TGT	GTC	TGG	CGC	GGG	AAC	CCA	CTT	1188
V	D	V	G	K	D	A	S	F	S	C	V	W	R	G	N	P	L	
CCA	CGG	ATA	ACC	TGG	ACC	CGC	ATG	GGT	GGC	TCT	CAG	GTG	CTG	AGC	TCC	GGG	CCC	1242
P	R	I	T	W	T	R	M	G	G	S	Q	V	L	S	S	G	P	
ACG	CTG	CGG	CTT	CCG	TCC	GTG	GCA	CTG	GAG	GAT	GCG	GGC	GAC	TAT	GTA	TGC	AGG	1296
T	L	R	L	P	S	V	A	L	E	D	A	G	D	Y	V	C	R	
GCT	GAG	CCG	AGG	AGA	ACG	GGT	CTG	GGA	GGC	GGC	AAA	GCG	CAG	GCG	AGG	CTG	ACT	1350
A	E	P	R	R	T	G	L	G	G	G	K	A	Q	A	R	L	T	
GTG	AAC	GCA	CCC	CCT	GTA	GTG	ACA	GCC	CTG	CAA	CCT	GCA	CCA	GCC	TTT	CTG	AGG	1404
V	N	A	P	P	V	V	T	A	L	Q	P	A	P	A	F	L	R	

2 / 1 4

2

GGT CCT GCT CGC CTC CAG TGT GTG GTG TTT GCC TCC CCT GCC CCA GAC TCG GTG	1458
G P A R L Q C V V F A S P A P D S V	
GTT TGG TCT TGG GAC GAG GGC TTC TTG GAG GCA GGC TCA CTG GGC AGG TTC CTA	1512
V W S W D E G F L E A G S L G R F L	
GTG GAA GCC TTC CCA GCC CCG GAA GTG GAG GGG GGA CAG GGC CCT GGC CTT ATT	1566
V E A F P A P E V E G G Q G P G L I	
TCT GTG CTA CAC ATT TCC GGA ACC CAG GAG TCC GAC TTT ACC ACC GGC TTC AAC	1620
S V L H I S G T Q E S D F T T G F N	
TGC AGT GCC CGC AAC CGG CTA GGA GAG GGA CGA GTC CAG ATC CAC TTG GGC CGT	1674
C S A R N R L G E G R V Q I H L G R	
AGA GAT TTG CTG CCT ACT GTC CGG ATT GTG GCT GGT GCA GCA TCT GCA GCC ACC	1728
R D L L P T V R I V A G A A S A A T	
TCT CTC CTT ATG GTC ATC ACT GGA GTG GTC CTC TGC TGC TGG CGC CAT GGC TCT	1782
S L L M V I T G V V L C C W R H G S	
CTC TCT AAG CAA AAG AAC TTG GTC CGG ATC CCA GGA AGC AGC GAG GGT TCC AGT	1836
L S K Q K N L V R I P G S S E G S S	
TCA CGT GGC CCT GAG GAG GAG ACA GGC AGC AGT GAG GAC CGG GGT CCC ATT GTG	1890
S R G P E E E T G S S E D R G P I V	
CAC ACC GAC CAC AGT GAT TTG GTT CTT GAG GAA AAA GAG GCT CTG GAG ACA AAG	1944
H T D H S D L V L E E K E A L E T K	
GAT CCA ACC AAC GGT TAC TAC AAG GTT CGA GGG GTC AGT GTG AGC CTT AGC CTT	1998
D P T N G Y Y K V R G V S V S L S L	
GGG GAA GCT CCT GGA GGA GGC CTC TTC TTG CCA CCG CCC TCT CCG ATC GGT CTC	2052
G E A P G G G L F L P P S P I G L	
CCA GGG ACT CCT ACT TAC TAT GAC TTC AAG CCA CAT CTG GAC TTA GTC CCT CCC	2106
P G T P T Y Y D F K P H L D L V P P	
TGC AGA CTG TAC AGA GCG AGG GCA GGT TAT CTT ACC ACC CCC CAT CCC CGT GCC	2160
C R L Y R A R A G Y L T T P H P R A	
TTC ACC AGC TAC ATG AAA CCC ACA TCC TTT GGA CCC CCA GAT TTG AGC TCT GGA	2214
F T S Y M K P T S F G P P D L S S G	
ACT CCC CCC TTC CCG TAT GCT ACC TTG TCT CCA CCC AGC CAC CAG CGT CTC CAG	2268
T P P F P Y A T L S P P S H Q R L Q	
ACT CAT GTG TGA ATC CAT CTC TCC AAG TGA AGG GTC TTG GAA TCT TCT GTT TGC	2322
T H V *	
CAT ATA GTG TGT TGT CCA GAT TTC TGG GGA GTC AGA ACA AGT TGA TGA CCA ACC	2376
CCT CCA AAA CTG AAC ATT GAA GGA GGG AAA GAT CAT TAC AAG CAT CAG GAC TGT	2430
TGG TGT ACA CTC AGT TCA GCC AAA GTG GAT TCT CCA AGT GGG AGC AAT ATG GCC	2484
GCT TTC CCA TGA GAA AGA CAT TCA AGA TGG TGA CTA AAT GAC TAA ATA CTT TGC	2538
AGA GGG ACA AAG ATG GGA ACT AGG GAT ACG GAT GGA AGT AGT AGA GAA GAT ATA	2592
TGA CCA TCT GCA TCA AGA GGA AGG ATA ACA TAT GAC AAA TCA AGA TGA AAG AAA	2646
TAA TCC ACC CCA CCC CCA CGT CCT GGC CAA TAA GTA TAG CCT ACA TGG CTG	2700
TTC ATT ATC TGG GAA CCA AAA TGG CCA CTA TCT TGA CTC CTT CCT TAA AGA TAC	2754
AGA AAG AAT TGA ATC CAA GGA ATG GGG TAG GGT GGA AAT AGA AGA AAT GAA GGG	2808
GAC TCT TGG GCT AAG AAT ACT TAT GTT TAA TAA AAG GGG GAG GCA AAG ATG	2862
CAA AAA AAA AAA AAA AA	2876

図3

GAG AGA ATT GTG TGC AGA GAG AGG CTC CAG TCC AGC GTG GTG TGA GAG GCG TGC	54
TAT CAA GAA AGA AGT TGG AGG GGA ACC AGT GCA ACC CTA ACT CTA CGA GAT CTT	108
GGG GTA CAC ACA CTC GGG ATG CTG GCC TCC CTC CTC GTT TTC CTT TGC TGT	162
<u>M L A S A L L V F L C C</u>	
TTC AAA GGA CAT GCA GGG TGG TCC CGG TAC TGG ATA TCG GGG AAT TCA GCC AGT	216
<u>F K G H A G W S R Y W I S G N S A S</u>	
GGC CAG CAT GAC CTC CAC ATT AAG CCT GTG GAA TTG GAA GAT GAG GCA TCG TAT	270
<u>G Q H D L H I K P V E L E D E A S Y</u>	
GAG TGC CAG GCT TCG CAA GCA GGT CTC CGA TCA CGA CCA GCC CAA CTG CAC GTG	324
<u>E C Q A S Q A G L R S R P A Q L H V</u>	
ATG GTC CCC CCA GAA GCT CCC CAG GTA CTA GGC GGC CCC TCT GTG TCT CTG GTT	378
<u>M V P P E A P Q V L G G P S V S L V</u>	
GCT GGA GTT CCT GGA AAT CTG ACC TGT CGG AGT CGT GGG GAT TCC CGA CCT GCC	432
<u>A G V P G N L T C R S R G D S R P A</u>	
CCT GAA CTA CTG TGG TTC CGA GAT GGG ATC CGG CTG GAT GCG AGC AGC TTC CAC	486
<u>P E L L W F R D G I R L D A S S F H</u>	
CAG ACC ACG CTG AAG GAC AAG GCC ACT GGA ACA GTG GAA AAC ACC TTA TTC CTG	540
<u>Q T T L K D K A T G T V E N T L F L</u>	
ACC CCT TCC AGT CAT GAT GAT GGC GCC ACC TTG ATC TGC AGA GCG CGA AGC CAG	594
<u>T P S S H D D G A T L I C R A R S Q</u>	
GCC CTG CCC ACA GGG AGG GAC ACA GCT GTT ACA CTG AGC CTT CAG TAT CCC CCA	648
<u>A L P T G R D T A V T L S L Q Y P P</u>	
ATG GTG ACT CTG TCT GCT GAG CCC CAG ACT GTG CAG GAG GGA GAG AAG GTG ACT	702
<u>M V T L S A E P Q T V Q E G E K V T</u>	
TTC CTG TGT CAA GCC ACT GCC CAG CCT CCT GTC ACT GGC TAC AGG TGG GCG AAG	756
<u>F L C Q A T A Q P P V T G Y R W A K</u>	
GGG GGA TCC CCG GTG CTC GGG GCA CGT GGG CCA AGG TTG GAG GTC GTT GCA GAT	810
<u>G G S P V L G A R G P R L E V V A D</u>	
GCC ACT TTC CTG ACT GAG CCG GTG TCC TGC GAG GTC AGC AAC GCG GTC GGA AGC	864
<u>A T F L T E P V S C E V S N A V G S</u>	
GCC AAC CGC AGC ACG GCG CTG GAA GTG TTG TAT GGA CCC ATT CTG CAG GCA AAA	918
<u>A N R S T A L E V L Y G P I L Q A K</u>	
CCT AAG TCC GTG TCC GTG GAC GTG GGG AAA GAT GCC TCC TTC AGC TGT GTC TGG	972
<u>P K S V S V D V G K D A S F S C V W</u>	
CGC GGG AAC CCA CTT CCA CGG ATA ACC TGG ACC CGC ATG GGT GGC TCT CAG GTG	1026
<u>R G N P L P R I T W T R M G G S Q V</u>	
CTG AGC TCC GGG CCC ACG CTG CGG CTT CCG TCC GTG GCA CTG GAG GAT GCG GGC	1080
<u>L S S G P T L R L P S V A L E D A G</u>	
GAC TAT GTA TGC AGG GCT GAG CCG AGG AGA ACG GGT CTG GGA GGC GGC AAA GCG	1134
<u>D Y V C R A E P R R T G L G G G K A</u>	
CAG GCG AGG CTG ACT GTG AAC GCA CCC CCT GTA GTG ACA GCC CTG CAA CCT GCA	1188
<u>Q A R L T V N A P P V V T A L Q P A</u>	

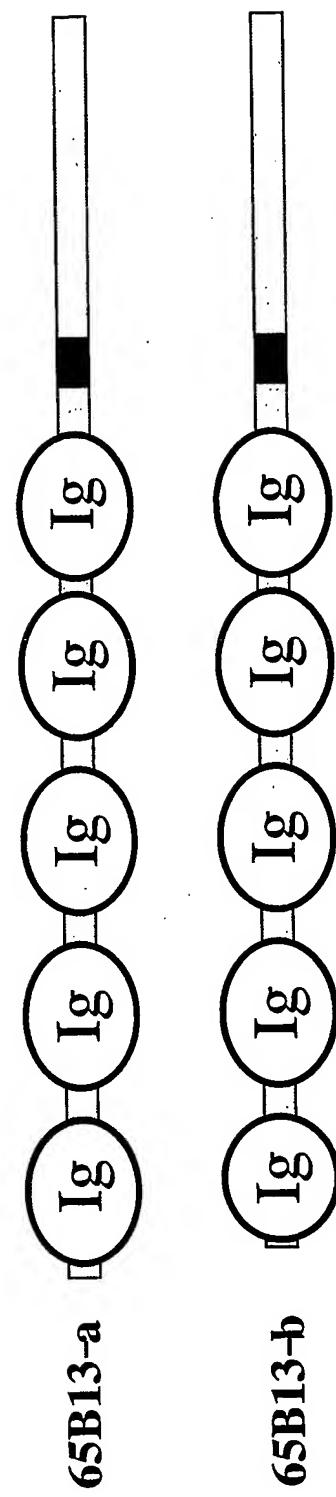
四 4

図5

		10	20	30	40	50
65B13-a	1	MLASALLVFI	CCFKGHACSS	PHEFLQOPEDM	VVLLGEEARL	PCALGAYRGL
65B13-b	1	MLASALLVFI	CCFKGHAC	-----	-----	-----
		60	70	80	90	100
65B13-a	51	VQWTKDGLAL	GGERDLPGWS	RYWISGNSAS	GQHDLHIKPV	FLEDEASYEC
65B13-b	51	-----	WS	RYWISGNSAS	GQHDLHIKPV	ELEDEASYEC
		110	120	130	140	150
65B13-a	101	QASQAGLRSR	PAQLHVMVPP	EAPQVLCGPS	VSLVAGVPGN	LTCRSRGDSR
65B13-b	101	QASQAGLRSR	PAQLHVMVPP	EAPQVLCGPS	VSLVAGVPGN	LTCRSRGDSR
		160	170	180	190	200
65B13-a	151	PAPELIMFRD	GIRLDASSFH	QTTLKDKATG	TVENTLPLTP	SSHDDGATLJ
65B13-b	151	PAPELIMFRD	GIRLDASSFH	QTTLKDKATG	TVENTLPLTP	SSHDDGATLJ
		210	220	230	240	250
65B13-a	201	CRARSQALPT	GRDTAVTLSI	QYPPMVTLSA	EPQTIVQEGER	VTFLCOATAQ
65B13-b	201	CRARSOALPT	GRDTAVTLSI	QYPPMVTLSA	EPOTIVQEGER	VTFLCOATAQ
		260	270	280	290	300
65B13-a	251	PPVTGYRWAK	GGSPVILGARG	PRLEWADAT	FLTHPVSCEV	SNAVGSANRS
65B13-b	251	PPVTGYRWAK	GGSPVILGARG	PRLEWADAT	FLTHPVSCEV	SNAVGSANRS
		310	320	330	340	350
65B13-a	301	TALEVLYGPI	LOAKPKSVSV	DVGKDASFSC	VWRGNPLPRI	TWTRMGGSOV
65B13-b	301	TALEVLYGPI	LOAKPKSVSV	DVGKDASFSC	VWRGNPLPRI	TWTRMGGSOV
		360	370	380	390	400
65B13-a	351	LSSGPTLRLP	SVALEDAAGDY	VCRAEPRRTIG	IGGGKAQARI	TVNAPPVVTA
65B13-b	351	LSSGPTLRLP	SVALEDAAGDY	VCRAEPRRTIG	IGGGKAQARI	TVNAPPVVTA
		410	420	430	440	450
65B13-a	401	LQPAPAFLRG	PARLQCVVFA	SPAPDSVVWS	WDEGFLEAGS	LGRELVEAFFF
65B13-b	401	LQPAPAFLRG	PARLQCVVFA	SPAPDSVVWS	WDEGFLEAGS	LGRELVEAFFF
		460	470	480	490	500
65B13-a	451	APEVEGGQGP	GLISVLIHISG	TQESDFTTIGI	NCSARNRLGE	GRVOIHLGRR
65B13-b	451	APEVRCGOGP	GLISVLIHISG	TQESDFTTIGI	NCSARNRLGE	GRVOIHLGRR
		510	520	530	540	550
65B13-a	501	DLLPTVTRVA	GAASAATSLL	MVITGVVLCC	WRIGSLSKQK	NLVRIPGSSE
65B13-b	501	DLLPTVTRVA	GAASAATSLL	MVITGVVLCC	WRIGSLSKQK	NLVRIPGSSE
		560	570	580	590	600
65B13-a	551	GSSSRGPPEEE	TGSSEDRGPJ	VHTDHSDLVL	EEKEALEFTKL	PTNGYYKVRC
65B13-b	551	GSSSRGPPEEE	TGSSEDRGPJ	VHTDHSDIVI	EEKEALEFTKL	PTNGYYKVRC
		610	620	630	640	650
65B13-a	601	VSVSLSLGEA	PGGGLFLPPP	SPIGLPGFPJ	YYDFKPHIDL	VPPCRLYRAR
65B13-b	601	VSVSLSLGEA	PGGGLFLPPP	SPIGLPGFPJ	YYDFKPHQDI	VPPCRLYRAP
		660	670	680	690	700
65B13-a	651	AGYLTPHPHR	AFTSYMKPITS	FGPPDLSSGI	PPFPYATLSP	PSHORLQTHV
65B13-b	651	AGYLTPHPHR	AFTSYMKPITS	FGPPDLSSGI	PPFPYATLSP	PSHORLQTHV

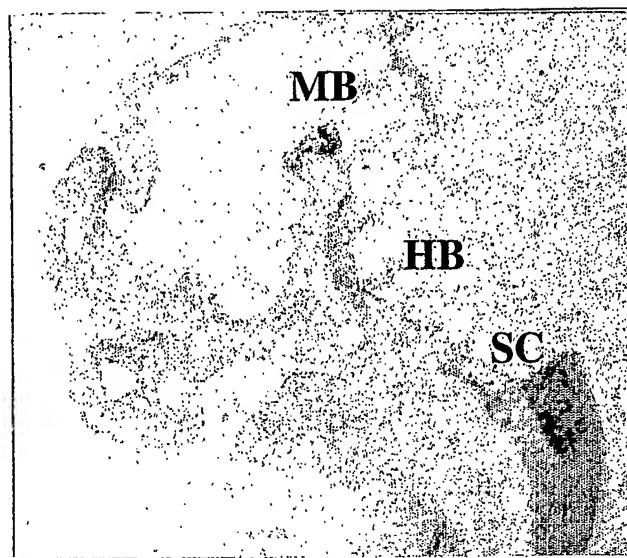
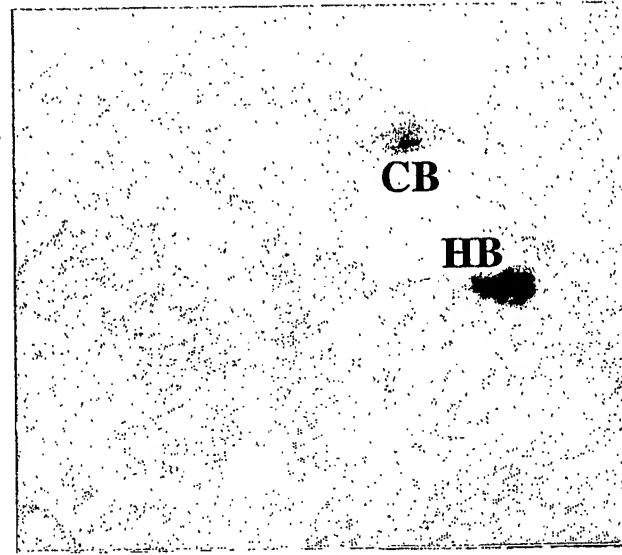
6 / 14

図 6



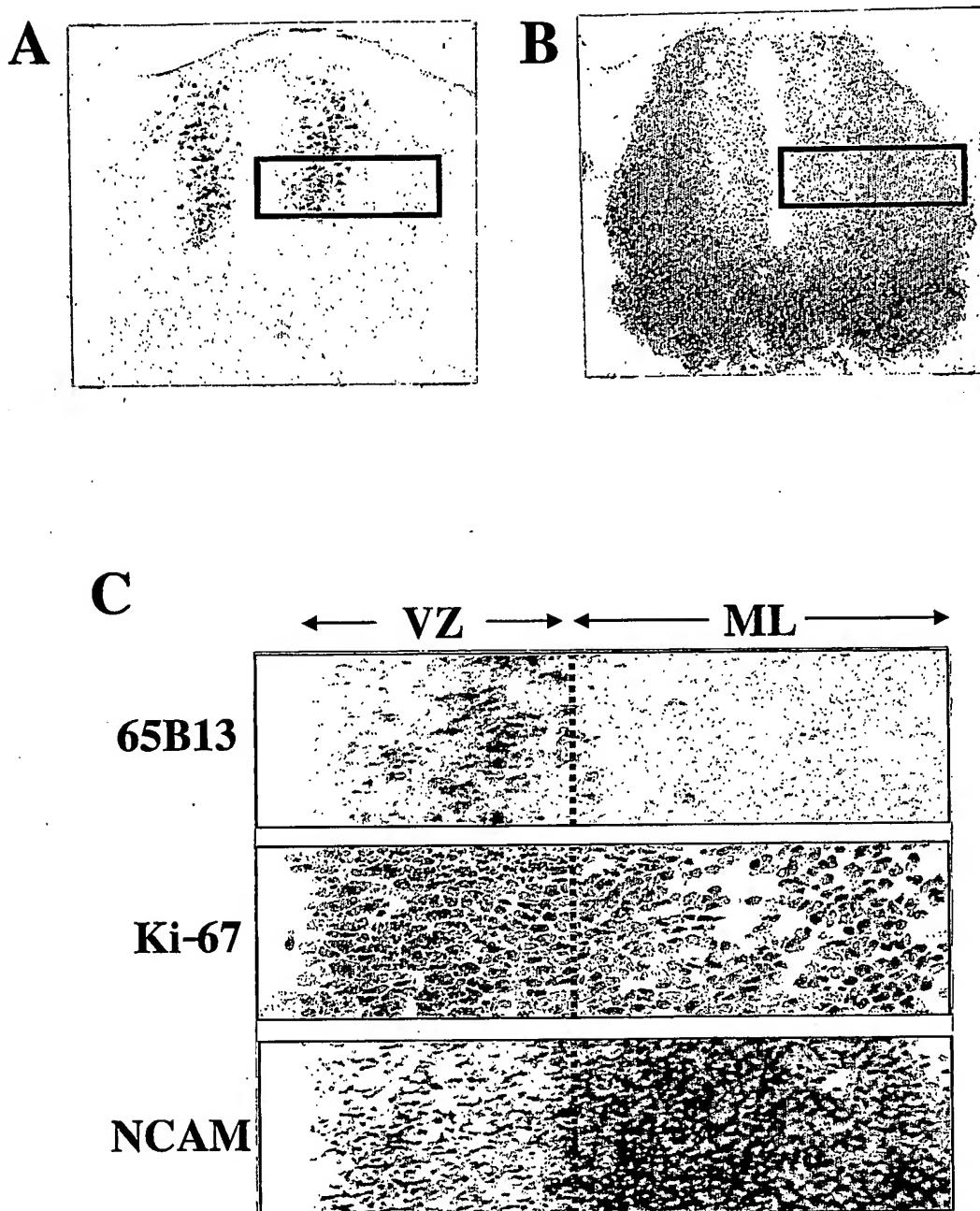
7 / 14

図 7

A**B**

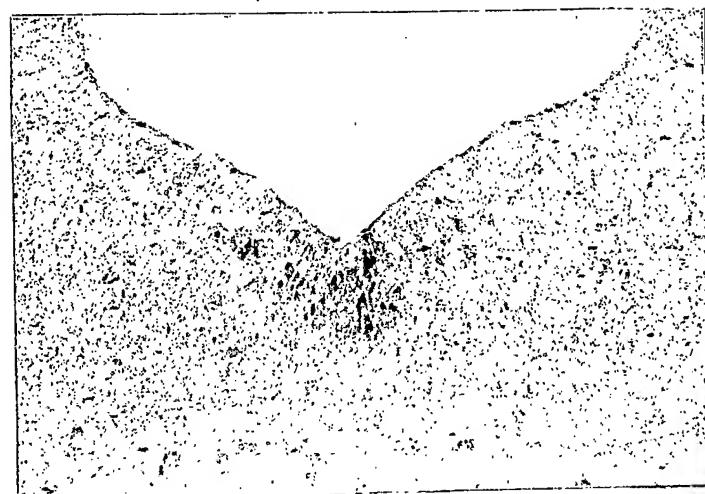
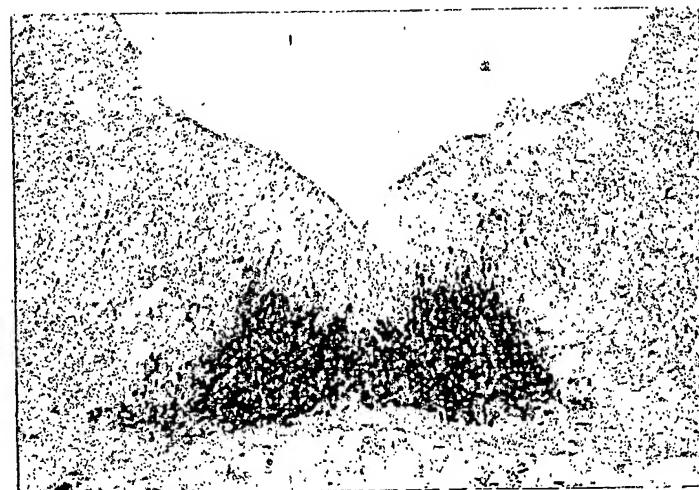
8 / 14

図 8



9 / 14

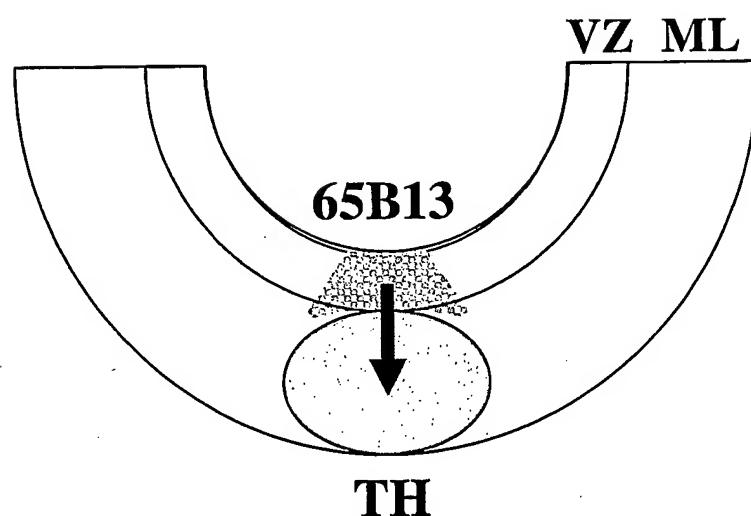
図 9

A**B**

10 / 14

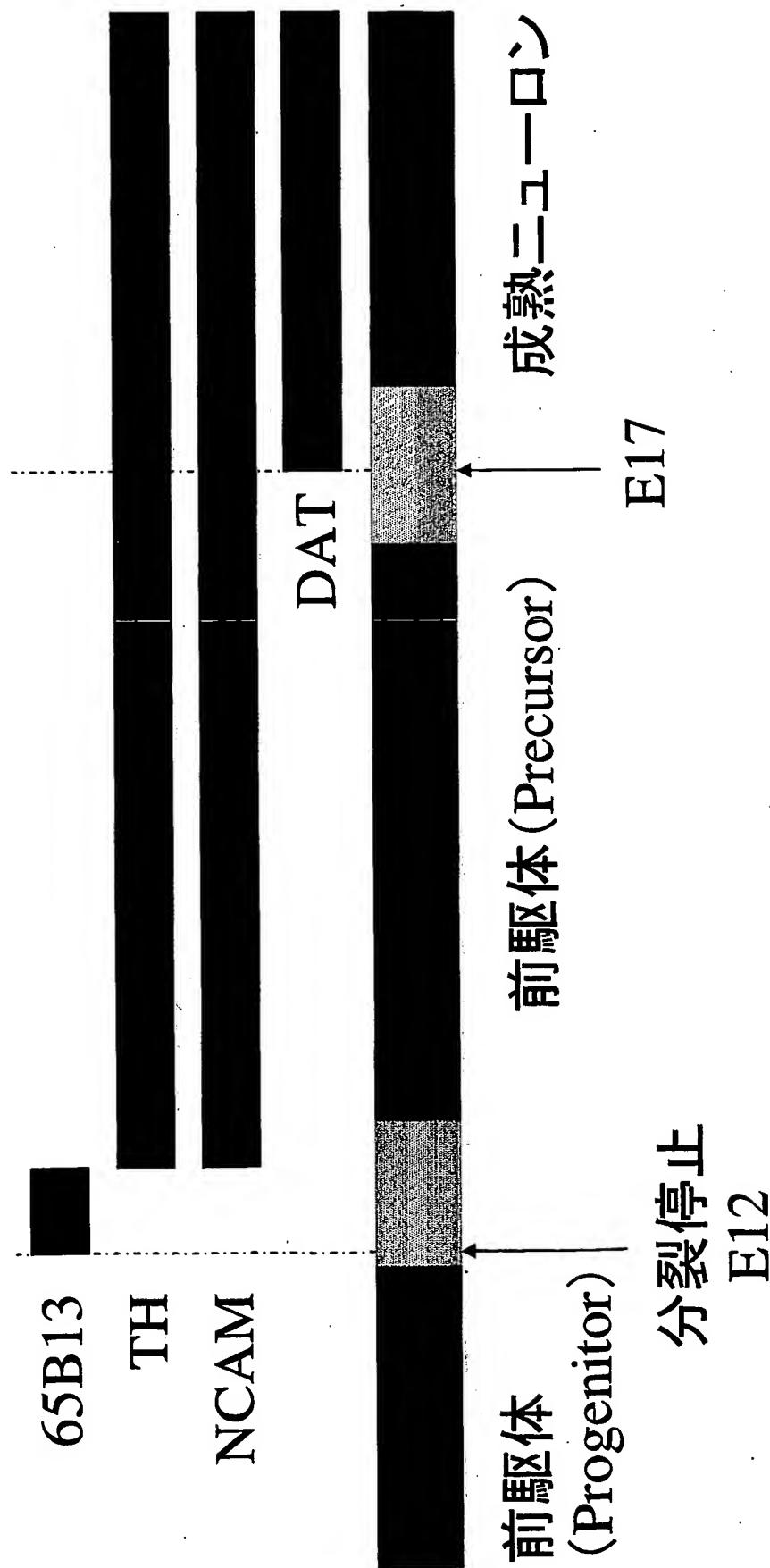
図 10

中脳腹側



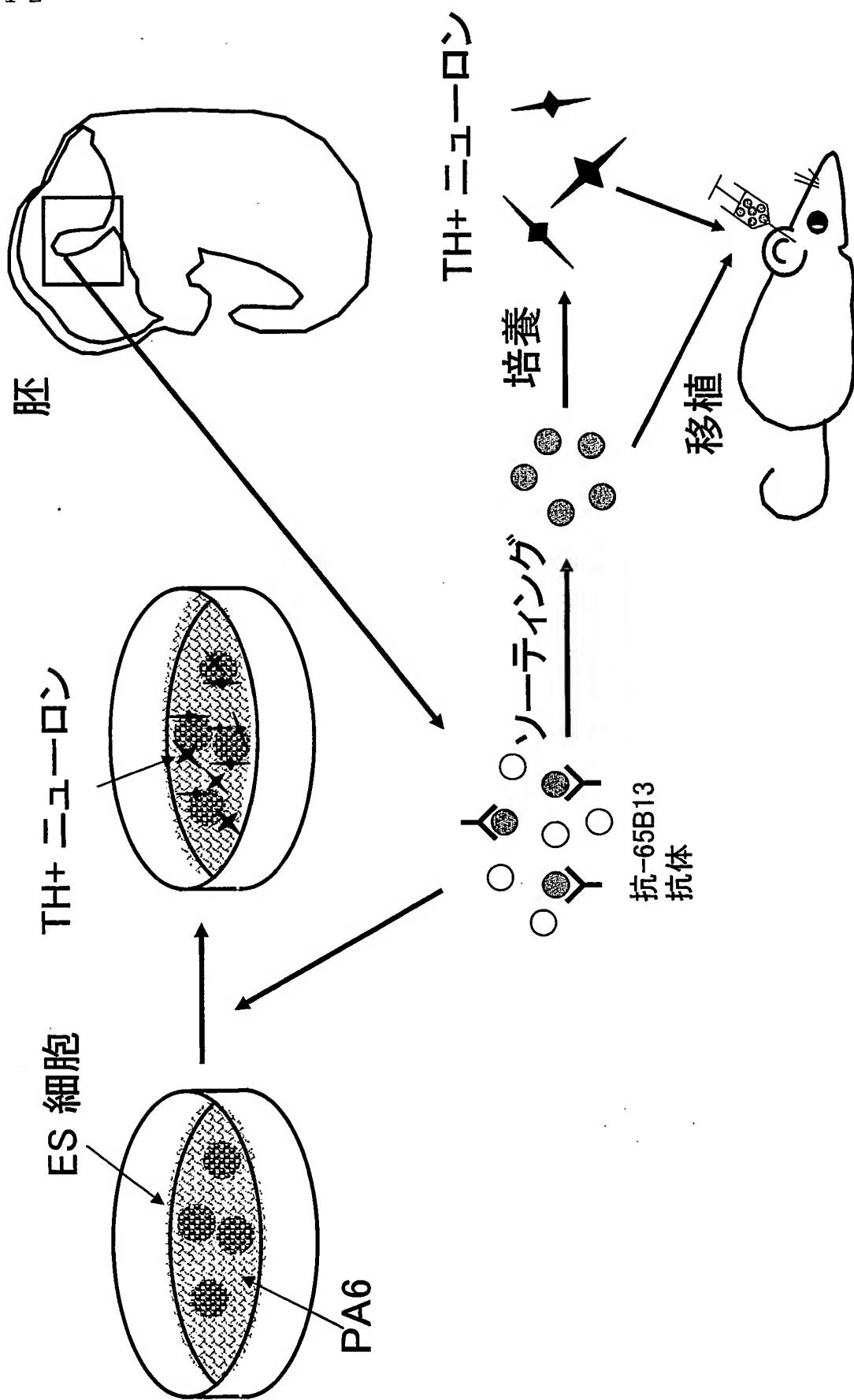
11/14

図 11



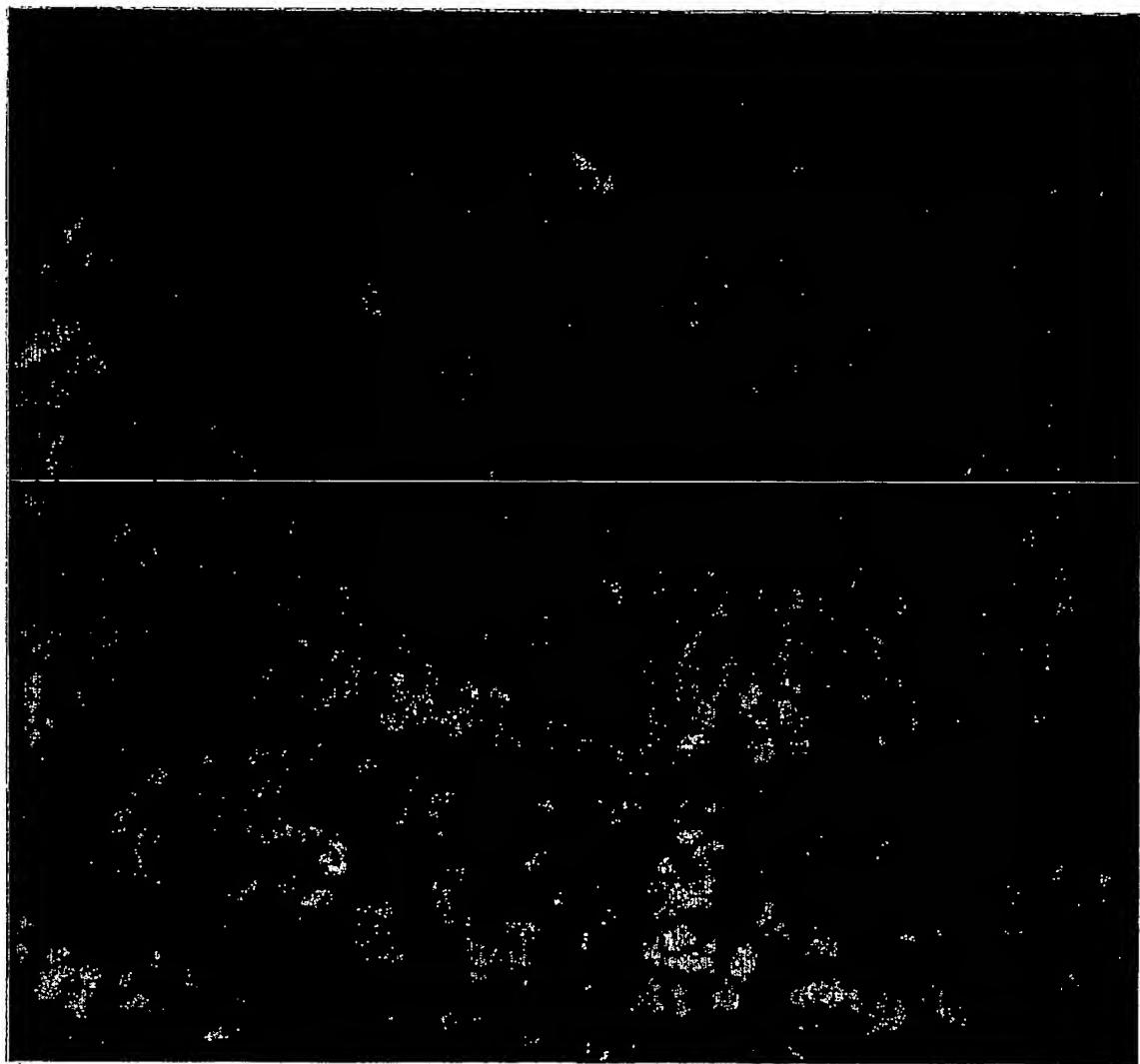
12 / 14

図 12



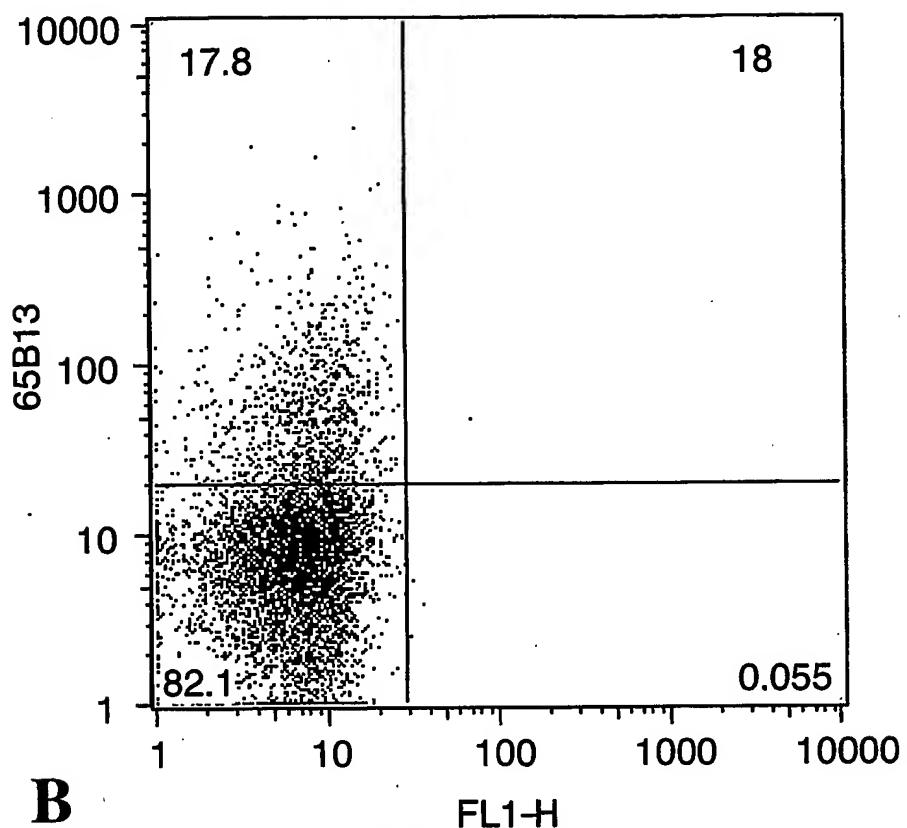
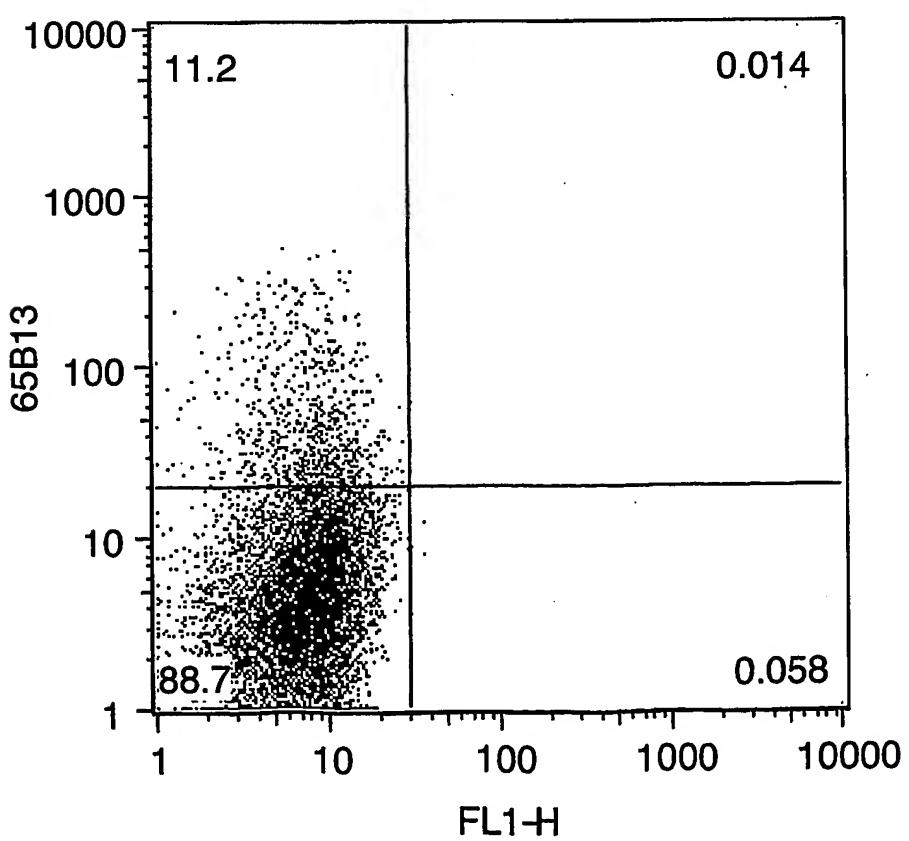
13/14

図13



14/14

図14

A**B**

1 / 3 9

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> Gene specifically expressed in postmitotic dopaminergic neuronal precursor

<130> E1-A0203P

<150> JP 2002-307573

<151> 2002-10-22

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2876

<212> DNA

<213> mouse

<400> 1

gatgagccag atttcgggga ctctggcca gacataaaat ctccagccc ggagagaatt 60
gtgtgcagag aggggctcca gtccagcggtg gtgtgagagg cggtatca agaaagaagt 120
tggagggaa ccagtcaac cctaactcta cgagatcttgggtacacac actcggatg 180
ctggcctccg cccctctcgt tttcctttgc tgtttcaaag gacatgcagg ctcatgcgg 240

catttctac aacagccaga ggacatggtg gtgctgttgg gggaggaagc ccggctgtccc 300
tgcgtctgg ggcgtacag ggggtcggt cagtgacta aggtatggct ggctctatggg 360
ggcgaaagag accttccagg gtggtcccgg tactggatat cgggaaattc agccagtggtc 420
cagcatgacc tccacattaa gcctgtggaa ttggaagatg aggcacatgtt tgagtgccag 480
gttgcgaag cagggtctcg atcacgacca gcccaactgc acgigatggt ccccccagaa 540
gttccccagg tactaggcgg cccctctgtg tctctggtttgc ctggagttcc tggaaatctg 600
acctgtcgga gtcgtggga ttcccgacct gcccctgaac tacigtggttt ccgagatggg 660
atccggctgg atgcgagcag ctccaccag accacgctga aggacaaggc cactggaaaca 720
gigggaaaaca ctttattcctt gacccttcc agtcatgtatg atggcgccac ctgtatctgc 780
agagcgcgaa gccaggccct gcccacaggg agggacacag ctgttacact gagccttcag 840
tatccccaa tggtgactct gtctgtcgag cccagactg tgcaggaggg agagaagggt 900
actttctgt gtcaagccac tgcccagctt cctgtcactg gctacagggtt ggcgaagggg 960
ggatccccgg tgctcggggc acgtgggcca aggttggagg tcgttgcaga tgccactttc 1020
ctgactgagc cgggtgtccgt cgaggtcagc aacgcggtcg gaagcgccaa ccgcagcacg 1080
gcgcggaaag tggccctt cagctgtgtc tggcgccggaa acccacttcc acggataacc 1140
tggacccgca tgggtggctc tcaggtgtcg agctccggc ccacgctgcg gcttccgtcc 1200
gtggcactgg aggaatgcggg cgactatgtt tgcagggtcg agccgaggag aacgggtctg 1260
ggaggcggca aagcgcaggc gaggctgact gtgaacgcac cccctgttagt gacagccctg 1320
caacctgcac cagccttctt gaggggtctt gtcgcctcc agtgtgtggt gtttccctcc 1380
cctgccccag actcgggttgtt tggctttgg gacgagggtt tcttggaggc aggctcactg 1440
ggcagggttcc tagtggaaagc ctccccagcc ccggaaatggg aggggggaca gggccctggc 1500
cttatttctg tgctacacat ttccggaaacc caggagtcgg accttaccac cggcttcaac 1560
tgcagtgcctt gcaaccggctt aggagaggga cgagtccaga tccacttggg ccgttagagat 1620
ttgctgccta ctgtccggat tggctgtgtt gtcgcctcc cagccaccc tctcctttagt 1680
gtcatcactg gagtggctt ctgtgtgg cggcatggctt ctctctctaa gcaaaaagaac 1740
1800

3 / 3 9

ttggtccgga tcccaggaag cagcgagggt tccagttcac gtggccctga ggaggagaca 1860
ggcagcagtg aggaccgggg tcccattgtg cacaccgacc acagtgattt ggttctttag 1920
aaaaaagagg ctctggagac aaaggatcca accaacggtt actacaaggt tcgaggggtc 1980
agtgtgagcc tttagccttgg ggaagctcct ggaggaggcc tcttcttgcc accgcctct 2040
ccgatcggtc tcccagggac tcctacttac tatgacttca agccacatct ggacttagtc 2100
cctccctgca gactgtacag agcgagggca ggttatctta ccaccccca tccccgtgcc 2160
ttcaccagct acatgaaacc cacatcctt ggaccccccag attttagctc tggaactccc 2220
cccttccgt atgctaccctt gtctccaccc agccaccagc gtcicccagac tcatgtgtga 2280
atccatctct ccaagtgaag ggcttggaa tcttctgttt gccatatagt gtgttgtcca 2340
gatttctggg gagtcaaaac aagtgtatga ccaaccctc caaaactgaa catigaagga 2400
gggaaagatc attacaagca tcaggactgt tggtgtacac tcagttcagc caaagtggat 2460
tctccaagtg ggagcaatat ggccgcttc ccatgagaaa gacattcaag atggtgacta 2520
aatgactaaa tactttgcag agggacaaag atggaaacta gggatacggg tggaagttagt 2580
agagaagata tatgaccatc tgcatcaaga ggaaggataa catatgacaa atcaagatga 2640
aagaaataat ccacccacc cccaccgcgt cctggccaat aagtatagcc tacatggctg 2700
ttcattatct gggacccaaa atggccacta tcttgactcc ttccttaaag atacagaaag 2760
aatigaatcc aaggaatggg gttagggtgga aatagaagaa atgaagggga ctcttggct 2820
aagaatactt atgttaata ataaaagggg gaggcaaaga tgcaaaaaaaa aaaaaaa 2876

<210> 2

<211> 2243

<212> DNA

<213> mouse

<400> 2

5 / 39

tgctgtggc gccatggctc tctctctaag caaaaagaact tggtccggat cccaggaagc 1620
agcgagggtt ccagttcacg tggccctgag gaggagacag gcagcagtga ggaccgggtt 1680
cccattgtgc acaccgacca cagtgatttgc ttcttgagg aaaaagaggc tctggagaca 1740
aaggatccaa ccaacggta ctacaagggtt cgaggggtca gtgtgagcct tagccttggg 1800
gaagctccctg gaggaggcct ttcttgcca cgcgccttc cgtatcggtct cccagggact 1860
cctacttact atgacttcaa gccacatcag gacttagtcc ctccctgcag actgtacaga 1920
gcgagggcag gttatcttac cacccccat ccccggtct tcaccagcta catgaaaccc 1980
acatcccttg gaccccccaga tttagctctt ggaactcccc cttcccgta tgctacccttg 2040
tctccaccca gccaccagcg tctccagact catgtgtgaa tccatcttc caagtgaagg 2100
gtcttggaat ttctgttttgc ccatatagtg tgggtccag atttctgggg agtcagaaca 2160
agttagtgcac caacccctcc aaaactgaac attgaaggag ggaaagatca ttacaagcat 2220
caggactgtt ggtgtacact cag 2243

<210> 3

<211> 700

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Met Leu Ala Ser Ala Leu Leu Val Phe Leu Cys Cys Phe Lys Gly His

1

5

10

15

Ala Gly Ser Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp Met Val Val

20

25

30

6 / 39

Leu Leu Gly Glu Glu Ala Arg Leu Pro Cys Ala Leu Gly Ala Tyr Arg

35 40 45

Gly Leu Val Gln Trp Thr Lys Asp Gly Leu Ala Leu Gly Gly Glu Arg

50 55 60

Asp Leu Pro Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn Ser Ala Ser

65 70 75 80

Gly Gln His Asp Leu His Ile Lys Pro Val Glu Leu Glu Asp Glu Ala

85 90 95

Ser Tyr Glu Cys Gln Ala Ser Gln Ala Gly Leu Arg Ser Arg Pro Ala

100 105 110

Gln Leu His Val Met Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val Leu Gly Gly

115 120 125

Pro Ser Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Gly Asn Leu Thr Cys Arg

130 135 140

Ser Arg Gly Asp Ser Arg Pro Ala Pro Glu Leu Leu Trp Phe Arg Asp

145 150 155 160

Gly Ile Arg Leu Asp Ala Ser Ser Phe His Gln Thr Thr Leu Lys Asp

165 170 175

7 / 39

Lys Ala Thr Gly Thr Val Glu Asn Thr Leu Phe Leu Thr Pro Ser Ser

180

185

190

His Asp Asp Gly Ala Thr Leu Ile Cys Arg Ala Arg Ser Gln Ala Leu

195

200

205

Pro Thr Gly Arg Asp Thr Ala Val Thr Leu Ser Leu Gln Tyr Pro Pro

210

215

220

Met Val Thr Leu Ser Ala Glu Pro Gln Thr Val Gln Glu Gly Glu Lys

225

230

235

240

Val Thr Phe Leu Cys Gln Ala Thr Ala Gln Pro Pro Val Thr Gly Tyr

245

250

255

Arg Trp Ala Lys Gly Gly Ser Pro Val Leu Gly Ala Arg Gly Pro Arg

260

265

270

Leu Glu Val Val Ala Asp Ala Thr Phe Leu Thr Glu Pro Val Ser Cys

275

280

285

Glu Val Ser Asn Ala Val Gly Ser Ala Asn Arg Ser Thr Ala Leu Glu

290

295

300

Val Leu Tyr Gly Pro Ile Leu Gln Ala Lys Pro Lys Ser Val Ser Val

8 / 39

305 310 315 320

Asp Val Gly Lys Asp Ala Ser Phe Ser Cys Val Trp Arg Gly Asn Pro

325 330 335

Leu Pro Arg Ile Thr Trp Thr Arg Met Gly Gly Ser Gln Val Leu Ser

340 345 350

Ser Gly Pro Thr Leu Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Glu Asp Ala Gly

355 360 365

Asp Tyr Val Cys Arg Ala Glu Pro Arg Arg Thr Gly Leu Gly Gly Gly

370 375 380

Lys Ala Gln Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Pro Pro Val Val Thr Ala

385 390 395 400

Leu Gln Pro Ala Pro Ala Phe Leu Arg Gly Pro Ala Arg Leu Gln Cys

405 410 415

Val Val Phe Ala Ser Pro Ala Pro Asp Ser Val Val Trp Ser Trp Asp

420 425 430

Glu Gly Phe Leu Glu Ala Gly Ser Leu Gly Arg Phe Leu Val Glu Ala

435 440 445

9 / 39

Phe Pro Ala Pro Glu Val Glu Gly Gly Gln Gly Pro Gly Leu Ile Ser

450 455 460

Val Leu His Ile Ser Gly Thr Gln Glu Ser Asp Phe Thr Thr Gly Phe

465 470 475 480

Asn Cys Ser Ala Arg Asn Arg Leu Gly Glu Gly Arg Val Gln Ile His

485 490 495

Leu Gly Arg Arg Asp Leu Leu Pro Thr Val Arg Ile Val Ala Gly Ala

500 505 510

Ala Ser Ala Ala Thr Ser Leu Leu Met Val Ile Thr Gly Val Val Leu

515 520 525

Cys Cys Trp Arg His Gly Ser Leu Ser Lys Gln Lys Asn Leu Val Arg

530 535 540

Ile Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Ser Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu

545 550 555 560

Thr Gly Ser Ser Glu Asp Arg Gly Pro Ile Val His Thr Asp His Ser

565 570 575

Asp Leu Val Leu Glu Glu Lys Glu Ala Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr

580 585 590

10 / 3.9

Asn Gly Tyr Tyr Lys Val Arg Gly Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly

595

600

605

Glu Ala Pro Gly Gly Gly Leu Phe Leu Pro Pro Pro Ser Pro Ile Gly

610

615

620

Leu Pro Gly Thr Pro Thr Tyr Tyr Asp Phe Lys Pro His Leu Asp Leu

625

630

635

640

Val Pro Pro Cys Arg Leu Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr

645

650

655

Pro His Pro Arg Ala Phe Thr Ser Tyr Met Lys Pro Thr Ser Phe Gly

660

665

670

Pro Pro Asp Leu Ser Ser Gly Thr Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Thr Leu

675

680

685

Ser Pro Pro Ser His Gln Arg Leu Gln Thr His Val

690

695

700

<210> 4

<211> 650

<212> PRT

11/39

<213> mouse

<400> 4

Met Leu Ala Ser Ala Leu Leu Val Phe Leu Cys Cys Phe Lys Gly His

1

5

10

15

Ala Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn Ser Ala Ser Gly Gln

20

25

30

His Asp Leu His Ile Lys Pro Val Glu Leu Glu Asp Glu Ala Ser Tyr

35

40

45

Glu Cys Gln Ala Ser Gln Ala Gly Leu Arg Ser Arg Pro Ala Gln Leu

50

55

60

His Val Met Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val Leu Gly Gly Pro Ser

65

70

75

80

Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Gly Asn Leu Thr Cys Arg Ser Arg

85

90

95

Gly Asp Ser Arg Pro Ala Pro Glu Leu Leu Trp Phe Arg Asp Gly Ile

100

105

110

Arg Leu Asp Ala Ser Ser Phe His Gln Thr Thr Leu Lys Asp Lys Ala

115

120

125

12 / 39

Thr Gly Thr Val Glu Asn Thr Leu Phe Leu Thr Pro Ser Ser His Asp

130

135

140

Asp Gly Ala Thr Leu Ile Cys Arg Ala Arg Ser Gln Ala Leu Pro Thr

145

150

155

160

Gly Arg Asp Thr Ala Val Thr Leu Ser Leu Gln Tyr Pro Pro Met Val

165

170

175

Thr Leu Ser Ala Glu Pro Gln Thr Val Gln Glu Gly Glu Lys Val Thr

180

185

190

Phe Leu Cys Gln Ala Thr Ala Gln Pro Pro Val Thr Gly Tyr Arg Trp

195

200

205

Ala Lys Gly Gly Ser Pro Val Leu Gly Ala Arg Gly Pro Arg Leu Glu

210

215

220

Val Val Ala Asp Ala Thr Phe Leu Thr Glu Pro Val Ser Cys Glu Val

225

230

235

240

Ser Asn Ala Val Gly Ser Ala Asn Arg Ser Thr Ala Leu Glu Val Leu

245

250

255

Tyr Gly Pro Ile Leu Gln Ala Lys Pro Lys Ser Val Ser Val Asp Val

1 3 / 3 9

260

265

270

Gly Lys Asp Ala Ser Phe Ser Cys Val Trp Arg Gly Asn Pro Leu Pro

275

280

285

Arg Ile Thr Trp Thr Arg Met Gly Gly Ser Gln Val Leu Ser Ser Gly

290

295

300

Pro Thr Leu Arg Leu Pro Ser Val Ala Leu Glu Asp Ala Gly Asp Tyr

305

310

315

320

Val Cys Arg Ala Glu Pro Arg Arg Thr Gly Leu Gly Gly Lys Ala

325

330

335

Gln Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Pro Pro Val Val Thr Ala Leu Gln

340

345

350

Pro Ala Pro Ala Phe Leu Arg Gly Pro Ala Arg Leu Gln Cys Val Val

355

360

365

Phe Ala Ser Pro Ala Pro Asp Ser Val Val Trp Ser Trp Asp Glu Gly

370

375

380

Phe Leu Glu Ala Gly Ser Leu Gly Arg Phe Leu Val Glu Ala Phe Pro

385

390

395

400

14/39

Ala Pro Glu Val Glu Gly Gly Gln Gly Pro Gly Leu Ile Ser Val Leu

405

410

415

His Ile Ser Gly Thr Gln Glu Ser Asp Phe Thr Thr Gly Phe Asn Cys

420

425

430

Ser Ala Arg Asn Arg Leu Gly Glu Gly Arg Val Gln Ile His Leu Gly

435

440

445

Arg Arg Asp Leu Leu Pro Thr Val Arg Ile Val Ala Gly Ala Ala Ser

450

455

460

Ala Ala Thr Ser Leu Leu Met Val Ile Thr Gly Val Val Leu Cys Cys

465

470

475

480

Trp Arg His Gly Ser Leu Ser Lys Gln Lys Asn Leu Val Arg Ile Pro

485

490

495

Gly Ser Ser Glu Gly Ser Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu Thr Gly

500

505

510

Ser Ser Glu Asp Arg Gly Pro Ile Val His Thr Asp His Ser Asp Leu

515

520

525

Val Leu Glu Glu Lys Glu Ala Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr Asn Gly

530

535

540

15/39

Tyr Tyr Lys Val Arg Gly Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly Glu Ala

545 550 555 560

Pro Gly Gly Gly Leu Phe Leu Pro Pro Pro Ser Pro Ile Gly Leu Pro

565 570 575

Gly Thr Pro Thr Tyr Tyr Asp Phe Lys Pro His Gln Asp Leu Val Pro

580 585 590

Pro Cys Arg Leu Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr Pro His

595 600 605

Pro Arg Ala Phe Thr Ser Tyr Met Lys Pro Thr Ser Phe Gly Pro Pro

610 615 620

Asp Leu Ser Ser Gly Thr Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Thr Leu Ser Pro

625 630 635 640

Pro Ser His Gln Arg Leu Gln Thr His Val

645 650

<210> 5

<211> 2980

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ccagagacc caggccgcgg aactggcagg cgttcagag cgtcagaggc tgcggatgag 60
cagacttgga ggactccagg ccagagacta ggctgggcga agagtcgagc gtgaaggggg 120
ctccgggcca gggtgacagg aggcgtgcii gagaggaaga agtgcacggg aaggccatgt 180
cgacggcaaa tctcgtgaac cttggggac gaatgcctcag gatgcgggtc cccgcctcc 240
tcgtccctcctt cttctgcctc agagggagag caggcccgtc gcccatttc ctgcaacagc 300
cagaggacct ggtggtgctg ctggggagg aagcccgct gccgtgtgc ctggcgccct 360
actggggct agttcagttgg actaagagtg ggctggccct agggggccaa agggacctac 420
cagggtggtc ccgttactgg atatcaggga atgcagccaa tggccagcat gaccctccaca 480
ttagccccgt ggagctagag gatgaagcat catatgaatg tcaggctaca caagcaggcc 540
tccgctccag accagcccaa ctgcacgtgc tggcccccc agaagcccc caggtgcigg 600
gcggccccc tttgtctctg gttgtggag tttctgcgaa cctgacatgt cggagccgtg 660
ggatgcccc ccctaccctt gaattgtgt ggttccgaga tgggtcctg ttggatggag 720
ccaccctcca tcaagaccctg ctgaaggaag ggacccttgg gtcatgtggag agcaccttaa 780
ccctgaccctt tttagccat gatgtggag ccacctttgt ctgccggcc cggagccagg 840
ccctgcccac aggaagagac acagctatca cactgaggct gcagtacccttccagaggta 900
ctctgtcigc ttgcacac actgtgcagg agggagagaa ggtcattttc ctgtggccagg 960
ccacagccca gcctcctgtc acaggctaca ggtggccaaa agggggctct ccgggtgcigc 1020
ggcccgccgg gccaaggta gaggtcgigg cagacgcctc gttccctgact gagccgtgt 1080
cctgcgaggt cagcaacgcc gttggtagcg ccaaccgcag tactgcgtg gatgtgtgt 1140
ttggccgat tctgcaggca aagccggagc ccgtgtccgt ggacgtgggg gaagacgcii 1200
ccctcagctg cgcctggcgc gggAACCCGCTTCCACGGGT AACCTGGACC CGCCGCGGTG 1260
gcgcgcagggt gctgggcctt ggagccacac tgcgtcttcc gtcgggtgggg cccgaggacg 1320
caggcgacta tttgtgcaga gctgaggctg ggctatcggtt ccgtcgggc ggcgcggcgg 1380

aggctcggt gactgtgaac gctcccccag tagtgaccgc cctgcactct ggcgcctgcct 1440
tcctgagggg ccctgctcgc ctccagtgic tggttttcgc ctctccgc ccagatgccg 1500
tggctcggtc ttggatgag ggcttcctgg aggccgggtc gcagggccgg tccctgg 1560
agacattccc tgccccagag agccgcgggg gactgggtcc gggccgtatc tctgtgtac 1620
acatttcggg gacccaggag tctgactta gcaggagctt taactgcgt gcccggaaacc 1680
ggctggcga gggaggtgcc caggccagcc tggccgttag agacttgctg cccactgtgc 1740
ggatagtggc cggagtggcc gctgcccacca caactctcct taiggtcatc actgggtgg 1800
ccctctgctg ctggcgccac agcaaggcct cagccctttt ctccgagcaa aagaacctga 1860
tgcgaatccc tggcagcagc gacggctcca gttcacgagg tcctgaagaa gaggagacag 1920
gcagccgcga ggaccggggc cccattgtgc acactgacca cagtgatctg gttctggagg 1980
agaaagggac tctggagacc aaggacccaa ccaacggta ctacaaggc cgaggagtc 2040
gtgtgaggct gaggcttggc gaagccctg gaggaggctt ctccctgcca ccaccctccc 2100
cccttggcc cccagggacc cctaccttct atgacttcaa cccacacccg ggcattgtcc 2160
ccccctgcag actttacaga gccagggcag gctatctcac cacacccac cctcgagctt 2220
tcaccagcta catcaaacc acatccttgc ggcccccaga tctggccccc gggactcccc 2280
ccttccata tgctgccttc cccacaccta gccacccgcg tctccagact cacgtgtac 2340
atcttccaa tggaaagatgc ctggatctc caacttgcca taatggatttgc 2400
tgaggcgcca ggacaagtttgc ggcacccatc tcctccaaaa ctgaacacaa ggggagggaa 2460
agatcattac atttgtcagg agcatttgttac tacagtccac tcagccaaag gagatgcccc 2520
aagtgggagc aacatggcca cccaaatatgc ccacccatc cccgggttaa aagagattca 2580
agatggcagg taggcccattt gaggagagat gggacaggg cagtgggtgt tgggatttgc 2640
ggccggat ggaagttgtt tctagccact gaaagaagat attcaagat gaccatctgc 2700
attgagagga aaggttagcat aggttagatg aagatgaaga gcataccagg cccaccccg 2760
gctctccctg agggaaactt tgctcgccatc atggaaatgc agccaaatgc gccatataact 2820
cccttaggaac ccaagatggc caccatcttgc atttactttt ccttaaagac tcagaaagac 2880
ttggacccaa ggagtgggaa tacagtggaa attaccactg ttggggcaaa atattggat 2940

18 / 39

aaaaatattt atgttaata ataaaaaaaaa gtcaaagagg 2980

<210> 6

<211> 708

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Leu Arg Met Arg Val Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Phe Cys Phe

1 5 10 15

Arg Gly Arg Ala Gly Pro Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp

20 25 30

Leu Val Val Leu Leu Gly Glu Ala Arg Leu Pro Cys Ala Leu Gly

35 40 45

Ala Tyr Trp Gly Leu Val Gln Trp Thr Lys Ser Gly Leu Ala Leu Gly

50 55 60

Gly Gln Arg Asp Leu Pro Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn

65 70 75 80

Ala Ala Asn Gly Gln His Asp Leu His Ile Arg Pro Val Glu Leu Glu

85 90 95

19 / 39

Asp Glu Ala Ser Tyr Glu Cys Gln Ala Thr Gln Ala Gly Leu Arg Ser

100

105

110

Arg Pro Ala Gln Leu His Val Leu Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val

115

120

125

Leu Gly Gly Pro Ser Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Ala Asn Leu

130

135

140

Thr Cys Arg Ser Arg Gly Asp Ala Arg Pro Thr Pro Glu Leu Leu Trp

145

150

155

160

Phe Arg Asp Gly Val Leu Leu Asp Gly Ala Thr Phe His Gln Thr Leu

165

170

175

Leu Lys Glu Gly Thr Pro Gly Ser Val Glu Ser Thr Leu Thr Leu Thr

180

185

190

Pro Phe Ser His Asp Asp Gly Ala Thr Phe Val Cys Arg Ala Arg Ser

195

200

205

Gln Ala Leu Pro Thr Gly Arg Asp Thr Ala Ile Thr Leu Ser Leu Gln

210

215

220

Tyr Pro Pro Glu Val Thr Leu Ser Ala Ser Pro His Thr Val Gln Glu

20 / 39

225 230 235 240

Gly Glu Lys Val Ile Phe Leu Cys Gln Ala Thr Ala Gln Pro Pro Val

245 250 255

Thr Gly Tyr Arg Trp Ala Lys Gly Gly Ser Pro Val Leu Gly Ala Arg

260 265 270

Gly Pro Arg Leu Glu Val Val Ala Asp Ala Ser Phe Leu Thr Glu Pro

275 280 285

Val Ser Cys Glu Val Ser Asn Ala Val Gly Ser Ala Asn Arg Ser Thr

290 295 300

Ala Leu Asp Val Leu Phe Gly Pro Ile Leu Gln Ala Lys Pro Glu Pro

305 310 315 320

Val Ser Val Asp Val Gly Glu Asp Ala Ser Phe Ser Cys Ala Trp Arg

325 330 335

Gly Asn Pro Leu Pro Arg Val Thr Trp Thr Arg Arg Gly Gly Ala Gln

340 345 350

Val Leu Gly Ser Gly Ala Thr Leu Arg Leu Pro Ser Val Gly Pro Glu

355 360 365

21 / 39

Asp Ala Gly Asp Tyr Val Cys Arg Ala Glu Ala Gly Leu Ser Gly Leu

370 375 380

Arg Gly Gly Ala Ala Glu Ala Arg Leu Thr Val Asn Ala Pro Pro Val

385 390 395 400

Val Thr Ala Leu His Ser Ala Pro Ala Phe Leu Arg Gly Pro Ala Arg

405 410 415

Leu Gln Cys Leu Val Phe Ala Ser Pro Ala Pro Asp Ala Val Val Trp

420 425 430

Ser Trp Asp Glu Gly Phe Leu Glu Ala Gly Ser Gln Gly Arg Phe Leu

435 440 445

Val Glu Thr Phe Pro Ala Pro Glu Ser Arg Gly Gly Leu Gly Pro Gly

450 455 460

Leu Ile Ser Val Leu His Ile Ser Gly Thr Gln Glu Ser Asp Phe Ser

465 470 475 480

Arg Ser Phe Asn Cys Ser Ala Arg Asn Arg Leu Gly Glu Gly Gly Ala

485 490 495

Gln Ala Ser Leu Gly Arg Arg Asp Leu Leu Pro Thr Val Arg Ile Val

500 505 510

22 / 39

Ala Gly Val Ala Ala Ala Thr Thr Thr Leu Leu Met Val Ile Thr Gly

515

520

525

Val Ala Leu Cys Cys Trp Arg His Ser Lys Ala Ser Ala Ser Phe Ser

530

535

540

Glu Gln Lys Asn Leu Met Arg Ile Pro Gly Ser Ser Asp Gly Ser Ser

545

550

555

560

Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu Thr Gly Ser Arg Glu Asp Arg Gly

565

570

575

Pro Ile Val His Thr Asp His Ser Asp Leu Val Leu Glu Glu Lys Gly

580

585

590

Thr Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr Asn Gly Tyr Tyr Lys Val Arg Gly

595

600

605

Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly Glu Ala Pro Gly Gly Leu Phe

610

615

620

Leu Pro Pro Pro Ser Pro Leu Gly Pro Pro Gly Thr Pro Thr Phe Tyr

625

630

635

640

Asp Phe Asn Pro His Leu Gly Met Val Pro Pro Cys Arg Leu Tyr Arg

23 / 39

645

650

655

Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr Pro His Pro Arg Ala Phe Thr Ser

660

665

670

Tyr Ile Lys Pro Thr Ser Phe Gly Pro Pro Asp Leu Ala Pro Gly Thr

675

680

685

Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Ala Phe Pro Thr Pro Ser His Pro Arg Leu

690

695

700

Gln Thr His Val

705

<210> 7

<211> 2976

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gggaactggc aggcgtttca gagcgtcaga ggctgcggat gagcagactt ggaggactcc 60
aggccagaga ctaggctggg cgaagagtgc agcgtgaagg gggctccggg ccagggtgac 120
aggaggcgtg cttagagagga agaagttagac gggaggcca gtgcgacggc aaatctcg 180
aaccttgggg gacgaatgt caggatgcgg gtcccccctt cctcttctgc 240
ttcagaggga gagcaggccc gtgcgtccat ttcctgtcaac agccagagga cctgggtgg 300

ctgctgggg aggaagcccg gctgccgtgt gctctggcg cctactgggg gctagttcag 360
tggactaaga gtgggctggc cctagggggc caaagggacc taccagggtg gtcccggtac 420
tggatatacag ggaatgcagc caatggccag catgaccctcc acattaggcc cgtggagcta 480
gaggatgaag catcatatga atgtcaggct acacaagcag gcctccgctc cagaccagcc 540
caactgcacg tgctggtccc cccagaagcc ccccagggtgc tggcggccc ctctgtgtct 600
ctggttgctg gagttcctgc gaacctgaca tgcggagcc gtggggatgc cggccctgccc 660
cctgaatigc tggtttcccg agatgggtc ctgttggatg gagccacctt ccatcagacc 720
ctgctgaagg aagggacccc tgggtcagtg gagagcacct taaccctgac cccctttcag 780
ccatgatgat ggagccacct ttgtctgccc ggcccgagc caggccctgc ccacaggaag 840
agacacagct atcacactga gcctgcagta ccccccaagag gtgactctgt ctgcttcgccc 900
acacactgtg caggagggag agaaggcat tttctgtgc caggccacag cccagccctcc 960
tgtcacaggc tacaggtggg caaaaggggg ctctccgggt ctcggggccc gcgggccaag 1020
gttagaggc gtggcagacg cctcggttccct gactgagccc gtgtctgcg aggtcagcaa 1080
cgccgtgggt agcgccaacc gcagttactgc gctggatgtc ctgttggc cgattctgca 1140
ggcaaagccg gagcccggtt ccgtggacgt ggggaagac gtttccttca gctgcgcctg 1200
gcgcgggaac cgccttccac gggtaacctg gaccgcgcgc ggtggcgcgc aggtcgtggg 1260
ctctggagcc acactgcgtc ttccgtcggt gggcccgag gacgcaggcg actatgtgt 1320
cagagctgag gctggctat cggccctgcg gggcggcgcc gcggaggctc ggctgactgt 1380
gaacgctccc ccagtagtga ccgcctgca ctctgcgcct gccttcctga gggccctgc 1440
tcgcctccag tgtctggttt tcgcctctcc cgccccagat gccgtggctt ggtcttggga 1500
tgagggcttc ctggaggcgg ggtcgccagg ccggttccgt gtggagacat tccctgcccc 1560
agagagccgc gggggactgg gtccggccct gatctctgtc ctacacattt cggggaccca 1620
ggagctgac tttagcagga gctttaactg cagtgcggg aaccggctgg gcgagggagg 1680
tgcccaggcc agccctggcc gtagagactt gcgtccact gtgcggatag tggccggagt 1740
ggccgcgtgcc accacaactc tccatatggt catcaactggg gtggccctct gctgcgtggcg 1800
ccacagcaag gcctcagccct cttctccga gcaaaagaac ctgtatgcgaa tccctggcag 1860

25 / 39

cagcgacggc tccagttcac gaggcctga agaagaggag acaggcagcc gcgaggaccg 1920
gggccccatt gtgcacactg accacagtga tctggttctg gaggaggaag ggactctgga 1980
gaccaaggac ccaaccaacg gttactacaa ggtccgagga gtcagtgta gcctgagcct 2040
tggcgaagcc cctggaggag gtctcttcct gccaccaccc tcccccttg ggcccccagg 2100
gacccttacc ttctatgact tcaacccaca cctggcattg gtccccccct gcagacttta 2160
cagagccagg gcaggctatc tcaccacacc ccaccctcga gcttacacca gctacatcaa 2220
acccacatcc ttggggcccc cagatctggc cccgggact ccccccctcc cataatgtgc 2280
cttccccaca cctagccacc cgcgtctcca gactcacgtg tgacatctt ccaatggaag 2340
agtccctggga tctccaactt gccatccctgg attgttctga ttctgagga gccaggacaa 2400
gttggcgacc ttactccctcc aaaactgaac acaaggggag ggaaagatca ttacatttgt 2460
caggaggatt tgtatacagt cagctcagcc aaaggagatg ccccaagttgg gagcaacatg 2520
gccacccaaat atgcccacctt attccccgtt gtaaaagaga ttcaagatgg cagtaggc 2580
ctttagggag agatggggac agggcagtgg gtgttgggag ttggggccg ggatggaagt 2640
tgtttctagc cactgaaaga agatatttca agatgaccat ctgcatttgag aggaaaggta 2700
gcataggata gatgaagatg aagagcatac caggccccac cctggctctc cctgagggga 2760
actttgtcg gccaatggaa atgcagccaa gatggccata tactccctag gaacccaaga 2820
tggccaccat ctgtatttta ctttccttaa agacacagaa agacttggac ccaaggagtg 2880
gggatacagt gagaattacc actgttgggg caaaatattg ggataaaaat atttatgttt 2940
aataataaaa aaaagtcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 2976

<210> 8

<211> 196

<212> PRT

<213> Homo sapiens

26 / 39

<400> 8

Met Leu Arg Met Arg Val Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Phe Cys Phe

1

5

10

15

Arg Gly Arg Ala Gly Pro Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp

20

25

30

Leu Val Val Leu Leu Gly Glu Glu Ala Arg Leu Pro Cys Ala Leu Gly

35

40

45

Ala Tyr Trp Gly Leu Val Gln Trp Thr Lys Ser Gly Leu Ala Leu Gly

50

55

60

Gly Gln Arg Asp Leu Pro Gly Trp Ser Arg Tyr Trp Ile Ser Gly Asn

65

70

75

80

Ala Ala Asn Gly Gln His Asp Leu His Ile Arg Pro Val Glu Leu Glu

85

90

95

Asp Glu Ala Ser Tyr Glu Cys Gln Ala Thr Gln Ala Gly Leu Arg Ser

100

105

110

Arg Pro Ala Gln Leu His Val Leu Val Pro Pro Glu Ala Pro Gln Val

115

120

125

Leu Gly Gly Pro Ser Val Ser Leu Val Ala Gly Val Pro Ala Asn Leu

27 / 39

130

135

140

Thr Cys Arg Ser Arg Gly Asp Ala Arg Pro Ala Pro Glu Leu Leu Trp

145

150

155

160

Phe Arg Asp Gly Val Leu Leu Asp Gly Ala Thr Phe His Gln Thr Leu

165

170

175

Leu Lys Glu Gly Thr Pro Gly Ser Val Glu Ser Thr Leu Thr Leu Thr

180

185

190

Pro Phe Gln Pro

195

<210> 9

<211> 1532

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

cccaagagacc caggccgcgg aactggcagg cgtttcagag cgtcagaggc tgcggatgag 60
cagacttgga ggactccagg ccagagacta ggctgggcga agagtcgagc gigaaggggg 120
ctccgggcca gggtgacagg aggcgtgc tt gagaggaaga agttgacggg aaggccatgt 180
cgacggcaaa tctcgtgaac ctggggggac gaatgcgtcag gatgcgggtc cccgcctcc 240
tcgtccctcct ctctgtcttc agagggagag caggccgtc gccccatttc ctgcaacagc 300

28 / 39

cagaggacct ggtggtgctg ctggcgagg gaggtgccta ggccagcctg ggccgttagag 360
cctcagcctc tttctccgag caaaaagaacc tggatgcgaat ccctggcagc agcgacggct 420
ccagttcacg aggtcctgaa gaagaggaga caggcagccg cgaggaccgg ggccccattg 480
tgcacactga ccacagtgtat ctggttctgg aggaggaagg gactctggag accaaggacc 540
caaccaacgg ttactacaag gtccgaggag tcagtgtgag cctgagcctt ggcgaagccc 600
ctggaggagg tctcttcctg ccaccaccc cccccccttgg gcccccaggg acccctaccc 660
tctatgactt caacccacac ctggcatgg tccccccctg cagactttac agagccaggg 720
caggctctt caccacaccc caccctcgag ctttaccatcg ctacatcaa cccacatcct 780
ttggggcccc agatctggcc cccgggactc ccccttccc atatgtgcc tttccacac 840
ctagccaccc gcgtctccag actcacgtgt gacatctttc caatggaga gtcctggat 900
ctccaacttgc ccataatggta ttgttctgtat ttctgaggag ccaggacaag ttggcgacct 960
tactcctcca aaactgaaca caaggggagg gaaagatcat tacatttgtc aggagcati 1020
gtatacagtc agctcagcca aaggagatgc cccaaatggg agcaacatgg ccacccaata 1080
tgcccaccta ttccccggtg taaaagagat tcaagatggc aggtaggccc ttggaggaga 1140
gatggggaca gggcagtggg tgttgaggat ttggggccgg gatggaaagt tttctagcc 1200
actgaaagaa gatatttcaa gatgaccatc tgcattgaga gaaaaggtag cataggatag 1260
atgaagatga agagcataacc agggcccacc ctggctctcc ctgaggggaa ctttgcctgg 1320
ccaatggaaa tgcagccaaatggccatatactccctagg aacccaaatggatggccaccatc 1380
ttgatttac ttcccttaaa gactcagaaa gacttggacc caaggagtgg ggatacagt 1440
agaattacca ctgttgggc aaaatattgg gataaaaaata ttatgtttataataaaaa 1500
aaagtcaaaatggccaaaaaaa aaaaaaaaaaa aa 1532

<210> 10

<211> 219

<212> PRT

29 / 39

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Leu Arg Met Arg Val Pro Ala Leu Leu Val Leu Leu Phe Cys Phe

1

5

10

15

Arg Gly Arg Ala Gly Pro Ser Pro His Phe Leu Gln Gln Pro Glu Asp

20

25

30

Leu Val Val Leu Leu Gly Glu Gly Gly Ala Gln Ala Ser Leu Gly Arg

35

40

45

Arg Ala Ser Ala Ser Phe Ser Glu Gln Lys Asn Leu Met Arg Ile Pro

50

55

60

Gly Ser Ser Asp Gly Ser Ser Ser Arg Gly Pro Glu Glu Glu Glu Thr

65

70

75

80

Gly Ser Arg Glu Asp Arg Gly Pro Ile Val His Thr Asp His Ser Asp

85

90

95

Leu Val Leu Glu Glu Glu Gly Thr Leu Glu Thr Lys Asp Pro Thr Asn

100

105

110

Gly Tyr Tyr Lys Val Arg Gly Val Ser Val Ser Leu Ser Leu Gly Glu

115

120

125

30 / 39

Ala Pro Gly Gly Gly Leu Phe Leu Pro Pro Pro Ser Pro Leu Gly Pro

130

135

140

Pro Gly Thr Pro Thr Phe Tyr Asp Phe Asn Pro His Leu Gly Met Val

145

150

155

160

Pro Pro Cys Arg Leu Tyr Arg Ala Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Thr Pro

165

170

175

His Pro Arg Ala Phe Thr Ser Tyr Ile Lys Pro Thr Ser Phe Gly Pro

180

185

190

Pro Asp Leu Ala Pro Gly Thr Pro Pro Phe Pro Tyr Ala Ala Phe Pro

195

200

205

Thr Pro Ser His Pro Arg Leu Gln Thr His Val

210

215

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

31 / 39

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 11

cagctccaca acctacatca ttccgt

26

<210> 12

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 12

acggaatgat gt

12

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 2 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 13

gtccatcttc tctctgagac tctggt

26

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 14

accagagtct ca

12

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

33 / 39

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 15

ctgatgggtg tcttctgtga gtgtgt

26

<210> 16

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 16

acacacactcac ag

12

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

34 / 39

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 17

ccagcatcga gaatcagtgt gacagt

26

<210> 18

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 18

actgtcacac tg

12

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

35 / 39

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 19

gtcgatgaac ttcgactgtc gatcgt

26

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 20

acgatcgaca gt

12

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

3 6 / 3 9

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE

method

<400> 21

ggc~~t~~ttacac tttatgcttc cggctc

26

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE

method

<400> 22

cagctatgac catgattacg ccaagc

26

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

37 / 39

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE

method

<400> 23

aggcgattaa gttggtaac gccagg

26

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE

method

<400> 24

ccagtcacga cgttgtaaaa cgacgg

26

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

38 / 39

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE

method

<400> 25

cttcccgat gctaccttgt ctccac

26

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE

method

<400> 26

tccatctctc caagtgaagg gtcttg

26

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

39/39

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 27

ccaacagtc tgcatgcttg taatga

26

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for RACE
method

<400> 28

tccttcaatg ttcagtttg gagggg

26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9423754 A1 (The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services), 27 October, 1994 (27.10.94), & AU 9465312 A & EP 696205 A1 & JP 8-509215 A & US 5690927 A & US 5869463 A & DE 69429721 E & US 2002/0110546 A1	10-12/1-9
X	KORDOWER, J.H. et al., Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease, N. Engl. J. Med., 1995, Vol. 332, No. 17, pages 1118 to 1124	10-12/1-9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 November, 2003 (10.11.03)Date of mailing of the international search report
25 November, 2003 (25.11.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kazuhiro SAKURADA et al., "Seitai Shinkei Kansaibo Bunka no Bunshi Mechanism", Cell Technology, 2000, Vol.19, No.3, pages 398 to 405	10-12/1-9
X	Kazuhiro SAKURADA et al., "Seitai Shinkei Kansaibo o Hyoteki to shita Saisei Iryo", The Tissue Culture Engineering, 2000, Vol.26, No.8, pages 303 to 306	10-12/1-90
P, X	US 2003/0036150 A1 (GENETIC INC.), 20 February, 2003 (20.02.03), PRO#292 (Family: none)	5-7
A	LISITSYN, N.A. et al., Representational difference analysis: finding the differences between genomes, Trends Genet, 1995, Vol.11, No.8, pages 303 to 307	1-12

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

I n t. C 1. 7 C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

I n t. C 1. 7 C12N15/09, C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/48, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus/JST7580(JOIS),
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 9423754 A1 (The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services) 1994.10.27 & AU 9465312 A & EP 696205 A1 & JP 8-509215 A & US 5690927 A & US 5869463 A & DE 69429721 E & US 2002/0110546 A1	10-12/1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
10.11.03

国際調査報告の発送日 25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)
七條 里美

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KORDOWER, J. H. et al., Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease, N Engl J Med, 1995, Vol. 332, No. 17, pp. 1118-1124	10-12/1-9
X	桜田一洋他, 成体神経幹細胞分化の分子メカニズム, 細胞工学, 2000, Vol. 19, No. 3, pp. 398-405	10-12/1-9
X	桜田一洋, 成体神経幹細胞を標的とした再生医療, 組織培養工学, 2000, Vol. 26, No. 8, pp. 303-306	10-12/1-90
PX	US 2003/0036150 A1 (GENETIC INC) 2003.02.20 PRO#292 (ファミリーなし)	5-7
A	LISITSYN, N. A. et al., Representational difference analysis: finding the differences between genomes, Trends Genet, 1995, Vol. 11, No. 8, pp. 303-307	1-12